N° d'ordre : 68

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

MENTION SCIENCES

PAR

Yolande VIDAL

LICENCIÉE ÈS SCIENCES PHYSIQUES

Action de la lumière
sur le système : Amines (R,R')CH-NH_2 - Ninhydrine

Soutenue le 3 juillet 1970, devant la Commission d'Examen :

MM. J. JOUSSOT-DUBIEN, Professeur..... *Président.*

H. BOUAS-LAURENT, Professeur .....
E. NEUZIL, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux ..... } *Examinateurs.*

— 1970 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543508_0020

N° d'ordre : 68

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

MENTION SCIENCES

PAR

Yolande VIDAL

LICENCIÉE ÈS SCIENCES PHYSIQUES

Action de la lumière
sur le système : Amines $(R,R')CH\text{-}NH_2$ - Ninhydrine

Soutenue le 3 juillet 1970, devant la Commission d'Examen :

MM. J. JOUSSOT-DUBIEN, Professeur..... *Président.*

H. BOUAS-LAURENT, Professeur .....
E. NEUZIL, Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux ..... } *Examinateurs.*

— 1970 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE
DE BORDEAUX

F A C U L T E DES S C I E N C E S

Doyens honoraires : M. BRUS
M. CALAS

Doyen : M. VALADE

Professeurs honoraires :

M. KASTLER	Professeur a la Sorbonne
M. PISOT	Professeur à la Sorbonne
Mlle JOSIEN	Professeur a la Sorbonne
M. MILLOUX	
M. DANGEARD	
M. CAU	
M. GENEVOIS	
M. SCHOELLER	
M. AVEL	

Professeurs -

M. ROUSSET	Physique générale
M. ROGER	Mécanique rationnelle
M. WEILL	Anatomie comparée et embryogénie
M. DUFRESNOY	Mathématiques générales
M. LAFON	Physiologie générale
M. BOUNHIOL	Biologie animale
M. SERVANT	Physique
M. CALAS	Chimie organique
M. GAY	Cristallographie et minéralogie
M. PACAULT	Chimie Physique
M. DAVID	Physiologie végétale
M. BLAIZOT	Physiologie de la nutrition
M. COLMEZ	Méthodes mathématiques de la physiqu
M. CAMBAR	Biologie animale
M. VIGNEAUX	Géologie
M. PANOUSE	Zoologie
M. ARZELIES	Physique (détaché a la Faculté des Sciences du Maroc)
M. RIBEREAU-GAYON	Oenologie et chimie agricole
M. RISS	Mathématiques
M. GUIZONNIER	Physique
M. HAGET	Zoologie expérimentale
M. SEMIROT	Astronomie
M. CHASTEL	Physique nucléaire
M. HAGENMULLER	Chimie minérale

M. CREAC'H	Biologie animale
M. LOUDETTE	Mécanique physique
M. PATY	Chimie
M. BORDES	Préhistoire
M. SECHET	Botanique
M. BAGANAS	Mathématiques
M. VALENTIN	Radioélectricité
M. ENNOUCHI	Géologie
M. EYME	Botanique
M. RUAMPS	Physique électronique
M. FRAINNET	Chimie organique
M. HOARAU	Chimie physique
M. MARCHAND	Chimie
M. LALANDE	Chimie appliquée
M. GOTTIS	Géologie dynamique
M. LEMANCEAU	Chimie
M. CARDO	Psychophysiologie
M. ROCH	Physique
M. BELLON	Chimie (détaché a la Faculté des Sciences du Maroc)
M. CLASTRE	Cristallographie physique
M. JOUSSOT-DUBIEN	Chimie
M. VALADE	Chimie organique
M. SURDIN	Automatique
M. LABOUESSE	Biochimie
Mlle LAFFITTE	Physique
M. CLIN	Géologie
M. DESTRIAU	Chimie
M. BOTHOREL	Chimie
M. BLONDEL	Mathématiques
M. LASCOMBE	Chimie
M. RIMPAULT	Physique théorique
M. ANDRE	Zoologie et physiologie animale
M. SOURISSEAU	Chimie
M. LOCHET	Physique
M. VINDT	Biologie végétale
M. REGNIER	Mathématiques
M. PETIT	Physique corpusculaire
M. BARAUD	Chimie biologique
M. EMBERGER	Géologie
M. CHARRU	Physique
M. SIMONOFF	Chimie physique
M. BARETS	Biologie animale
M. PINEAU	Chimie
M. LEVEQUE	Géologie approfondie
M. BOUSSEAU	Physique
M. MENNRATH	Physique
M. BOUAS-LAURENT	Chimie organique
M. RIBEREAU-GAYON P.	Chimie oenologie
Mlle DUTRIEU	Physiologie animale
M. MOYES	Géologie
M. N.	Calcul infinitésimal
M. N.	Informatique
M. AUROUZE	Hydrogéologie

Maître de conférences honoraire -

M. DE PUYMALY

Maîtres de conférences -

Mme PETIT	Physique
M. BERNET	Génétique
M. FRESNEL	Mathématiques
M. LUTZ	Botanique
M. MOULINES	Chimie
M. POUCHARD	Chimie minérale
M. SARDOS	Physique
M. DUMERY	Mécanique
M. DRESS	Mathématiques
M. GARNIER	Biophysique
M. MENDES-FRANCE	Mathématiques
M. LESCA	Mathématiques
M. ARTOLA	Mathématiques
M. MARTINET	Mathématiques
M. BOUARD	Biologie végétale
M. MINNAERT	Physique théorique
M. ABGRALL	Physique théorique
M. DAMEY	Mathématiques
M. BOISSEAU	Biologie générale
M. NASLAIN	Chimie minérale
M. ONILLON	Chimie minérale
M. HOGBE	Mathématiques

Conseiller Administratif -

M. LLORENS.

*

*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Médicale "B" de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux dirigé par Monsieur le Professeur NEUZIL qui nous a proposé le sujet de cette thèse. Nous sommes heureux de lui adresser nos sincères remerciements pour les conseils dont il nous a fait bénéficier. Il a guidé notre expérimentation et nous a apporté une aide précieuse dans la rédaction de notre travail. Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur JOUSSOT-DUBIEN, dont nous avons particulièrement apprécié l'enseignement au cours de nos études à la Faculté des Sciences, nous fait aujourd'hui l'honneur de présider le jury de notre thèse. Nous lui exprimons notre plus vive reconnaissance pour ses nombreuses suggestions, les critiques constructives dont il nous a fait bénéficier, ainsi que pour l'accueil qu'il nous a réservé au Laboratoire de Chimie Physique où nous avons réalisé avec Monsieur FAURE un certain nombre de nos essais expérimentaux.

Nous adressons nos très vifs remerciements à Monsieur le Professeur BOUAS-LAURENT qui a bien voulu accepter de juger notre travail.

Enfin, nous ne saurions oublier dans nos remerciements tous ceux, Chercheurs et Techniciens du Laboratoire, qui nous ont apporté leur aide amicale et Mademoiselle SANCHEZ qui a eu la lourde tâche de dactylographier un texte souvent difficile.

I N T R O D U C T I O N

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Le travail que nous présentons concerne une réaction photochimique que fournissent certains composés aminés avec l'hydrate de tricétoindane ou ninhydrine. Nos recherches expérimentales ont été effectuées au Laboratoire de Biochimie Médicale "B" de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux, ou nous sommes entré comme attaché de faculté - assistant de sciences fondamentales.

En raison de notre formation initiale aupres de la Faculté des Sciences, en raison également de l'intérêt que nous avons manifesté pour la photochimie et des liens qui nous attachent au Laboratoire de Chimie Physique de Talence, Monsieur le Professeur Neuzil nous a demandé d'approfondir l'étude de la réaction photochimique qu'il avait décrite en 1961, en collaboration avec MM. Josselin et Breton.

Notre travail sera exposé selon le plan suivant :

Dans la premiere partie nous rapellerons brievement tout d'abord quelques notions essentielles sur la ninhydrine et sa réaction chimique principale, c'est-à-dire la réaction que fournit cette tricétone avec les composés aminés.

Nos recherches personnelles occupent la deuxieme partie de cette thèse et sont groupées en 5 chapîtres.

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR LA NINHYDRINE

DEUXIEME PARTIE : CONTRIBUTION PERSONNELLE

Chapître I

Exposé du probleme étudié.

Conditions opératoires standards.

Chapitre II

Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.

- Influence du temps d'irradiation,
- Influence de la concentration en phényl-1-amino-2-propane et en ninhydrine,
- Rendement en pourpre de Ruhemann,
- Influence du temps de contact et de la température d'incubation à l'obscurité,
- Influence de la nature et de la concentration en alcool,
- Influence de la concentration en sels,
- Spécificité d'action de la ninhydrine.

Chapître III

Réaction photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ avec la ninhydrine.

Chapître IV

Identification photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ en chromatographie de partage.

Chapitre V

Interprétation des résultats.

P R E M I E R E P A R T I E

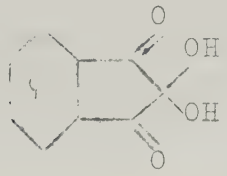
-. RAPPELS SUR LA NINHYDRINE .-

* * * * *

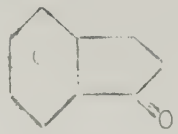
Nous rappellerons brièvement quelques notions fondamentales sur la ninhydrine et sa réactivité chimique ; le lecteur désireux d'obtenir des renseignements complémentaires, les trouvera dans les monographies de Breton [7] et de Neuzil [31].

I - SYNTHESE DE LA NINHYDRINE.

La ninhydrine (I) est le nom commercial donné par l'I.G. Farbenindustrie a l'hydrate du tricétohydrindène ou d'indanetrione-1,2,3 , composé synthétisé pour la premiere fois en 1910 a Cambridge par Ruhemann [61] à partir de l'indanone-1 (II).



I

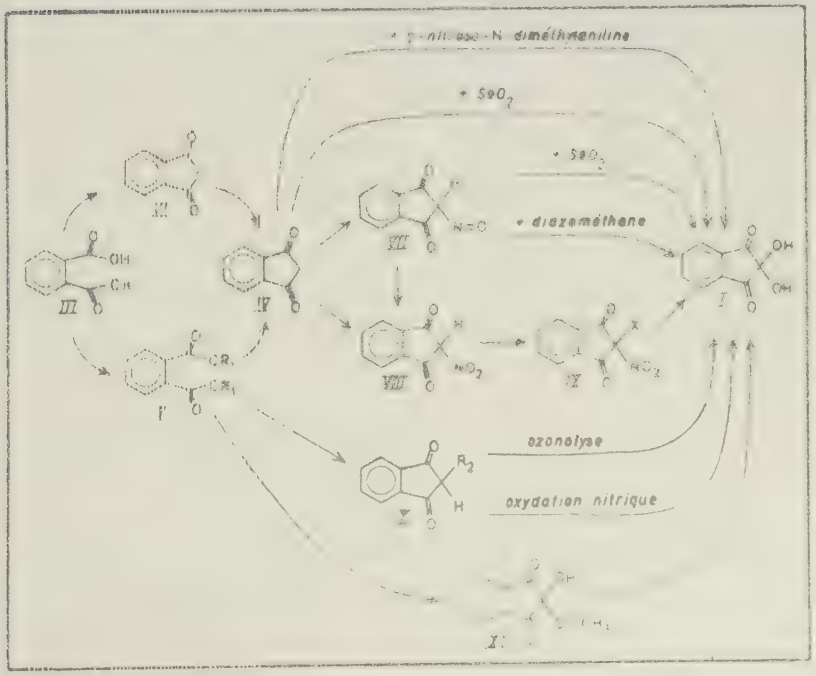


II

Depuis le travail initial de Ruhemann, de nombreuses synthèses de la ninhydrine ont été proposées qui partaient toutes de l'acide phtalique ; nous les avons résumées dans le tableau I, emprunté à un récent travail de notre laboratoire [47].

TABLEAU I

Synthèse de la ninhydrine à partir de l'acide phtalique.



La synthese initiale de Ruhemann mettait en oeuvre l'indanone-1, dont le produit de condensation avec la p-nitroso-N-diméthylaniline était soumis a l'hydrolyse sulfurique. Une synthèse plus simple à partir de l'indanone-1 a été récemment décrite par Neuzil et coll. [47], par oxydation sélénieuse directe de la monocétone.

La plupart des préparations actuelles passent par l'intermédiaire de l'indanedione-1,3 (IV), elle-même préparée a partir du phtalate d'éthyle (V, R_1 = C_2H_5) par la technique de Wislicenus [74, 75] ou encore a partir de l'anhydride phtalique (VI) [10]. La condensation de IV avec la p-nitroso-N-diméthylaniline et l'hydrolyse de l'aniline [62] ne conduisent qu'à un tres faible rendement. Au contraire, l'oxydation sélénieuse, entre les mains de Teeters et Shriner [70], s'est montrée une méthode de choix et a été largement utilisée depuis [10, 14, 68]. L'action de SeO_2 sur l'isonitroso-2-indanedione-1,3 (VII) [11], produit facile a obtenir à partir de l'indanedione-1,3 [57], améliore encore le rendement en ninhydrine.

Notons encore la préparation de la ninhydrine par action du diazométhane sur la nitroso-2-indanedione-1,3 [65] ou par transformation de IV en nitro-2-indanedione-1,3 (VIII) suivie de l'hydrolyse des dérivés halogenés en 2 correspondants (IX, X = Cl, Br ou I) [72, 73]. L'obtention de l'hydrate du tricétoindane par l'intermédiaire des acyl-2-indanediones-1,3, réalisée des 1920 [64] par ozonolyse de l'acétyl-2-indanedione-1,3 (X ; R_2= $-COCH_3$), a fait l'objet d'un brevet récent [8], qui met en oeuvre l'oxydation nitrique de la benzoyl-2-indanedione-1,3 (X ; R_2 = $-COC_6H_5$). Une derniere technique, préconisée par Becker et Russel [3, 4], réduit les étapes de la synthese de la tricétone : la condensation du phtalate d'éthyle avec le diméthyl-sulfoxyde fournit l'hydroxy-2-méthylthio-2-indanedione-1,3 (XI) ; l'hydrolyse chlorhydrique de ce dernier produit par l'intermédiaire de la chloro-2-méthylthio-2-indanedione-1,3, donne la tricétone indanique avec un rendement final de 80 p. 100.

II - PROPRIETES PHYSIQUES

L'hydrate d'indanetrione, obtenu par un des procédés décrits ci-dessus, est soumis a une purification. Cette opération s'effectue par recristallisation dans l'eau ou dans HCl, 2N (Hamilton et Ortiz [15]) ou

encore par passage sur une résine échangeuse d'ions [17, 18].

Ainsi purifiée, la ninhydrine se présente sous la forme de cristaux jaunes tres pâles, presque blancs, appartenant au systeme monoclinique avec hémiédrie énantiomorphe [7] ; une étude cristallographique complete a été présentée par Bocton [5], puis par Medrud [24]. Le point de fusion des cristaux varie, selon les différents auteurs, de 239° à 247°C [7] : cet écart relativement important est lié au fait que la ninhydrine, par chauffage, perd facilement une molécule d'eau en se transformant en tricétoindane, composé dont la sublimation permet de recueillir des aiguilles rouge-foncé. L'étude thermogravimétrique [40] montre que le départ d'eau commence a la température de 125°C.

La ninhydrine est soluble dans l'eau à la température du laboratoire ; la saturation correspond a une solution de concentration voisine de 2 p. 100. A chaud, la solubilité augmente considérablement [41]. La ninhydrine est également soluble dans les alcools, mais dans ces solvants se produit un déplacement de l'eau d'hydratation et la formation d'hémicétals. Ce phénomene a été étudié par la méthode spectrophotométrique par Neuzil et coll. [36, 40] qui par ailleurs ont pu isoler les hémicétals [43]. L'existence de ces hémicétals a été récemment confirmée par Gaumet [13].

L'étude spectrale de la ninhydrine a fait l'objet de nombreuses publications. On connaît son spectre ultra-violet [23, 26, 40, 56, 58], son spectre infra-rouge [2, 53], son spectre de résonance magnétique nucléaire [13], son spectre de résonance paramagnétique [1, 67].

Nous avons déterminé le spectre d'absorption de la ninhydrine ($200 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$) dans une solution hydro-alcoolique contenant un mélange équimoléculaire de phosphates monopotassique et dissodique et de l'alcool butylique tertiaire (75 % V/V), milieu que nous utiliserons de nombreuses fois. Nous avons réuni sur la figure 1 plusieurs tracés a différentes concentrations en dérivé indanique, de maniere a mettre nettement en évidence les caractéristiques de ce spectre.
La tricétone présente une premiere bande a $\lambda = 345$ nm. L'absorption diminue ensuite vers les courtes longueurs d'onde pour remonter brusquement a $\lambda = 315$ nm et atteindre un maximum situé a $\lambda = 228$ nm.

III - PROPRIETES CHIMIQUES

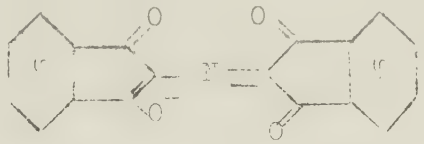
La présence de trois fonctions carbonylées dans la molécule de ninhydrine jointe a l'activation produite par le cycle benzénique, confère à l'hydrate d'indanetrione une réactivité chimique considérable.

La ninhydrine est assez résistante a l'action des acides mais fragile en milieu alcalin. Elle manifeste évidemment les réactions classiques des composés carbonylés : elle réagit avec divers agents réducteurs ou oxydants, l'ammoniaque, l'hydroxylamine, l'hydrazine et ses dérivés. Mais la propriété la plus caractéristique de la ninhydrine est la réaction colorée que fournit cette substance avec les dérivés aminés.

Réaction de la ninhydrine avec les composés aminés

a) Généralités

Cette réaction découverte d'abord avec les aminoacides par Ruhemann entre dans le cadre de la réaction de dégradation de Strecker(*). Lorsqu'on chauffe une solution aqueuse de ninhydrine avec un aminoacide a n atomes de C, il apparaît une coloration bleu-violacé plus ou moins intense ; on observe en outre un dégagement de gaz carbonique et l'apparition de l'aldéhyde en C_{n-1}. Le produit coloré formé est l'anion de la dicétohydrindylidene-dicétohydrindamine que l'on désigne plus couramment sous le nom de "pourpre de Ruhemann" (XII) :

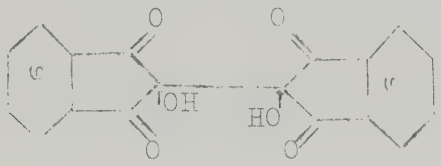


XII

La réaction est en réalité tres complexe, car on observe souvent, en outre, l'apparition d'un précipité formé de deux especes de cristaux [7] :

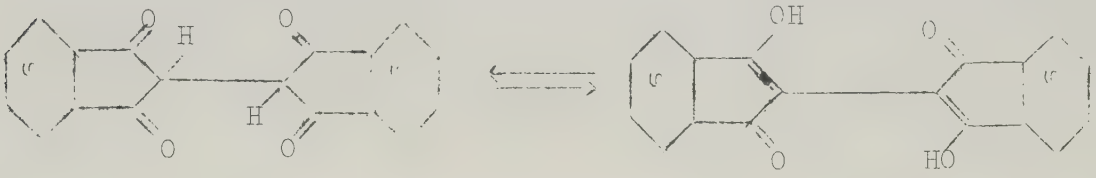
(*) Pour une revue générale détaillée de cette dégradation de Strecker, voir [66].

- des cristaux incolores, constitués de tables hexagonales, caractéristiques de l'hydrindantine (XIII) :



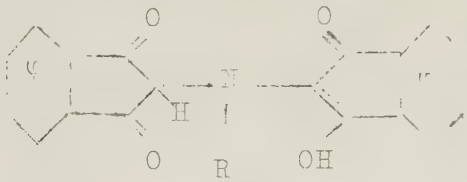
XIII

- des aiguilles rouges de bis-dicétoindanyle, composé non azoté pour lequel on peut proposer les deux formules tautomériques XIVa et XIVb ci-dessous :



XIV a XIV b

En outre, la chromatographie du mélange réactionnel montre que le pourpre de Ruhemann est souvent accompagné d'autres produits colorés hydrosolubles. Ceci est particulierement net avec la phénylalanine [20] ainsi qu'avec le glycocolle [54]. La présence d'autres composés colorés que le pourpre de Ruhemann, auxquels on peut attribuer la formule XV [20, 59], explique le fait que, sur un chromatogramme, les différents



XV

aminoacides fournissent des spots dont les colorations ne sont pas toujours strictement identiques. Aussi de tres nombreux schémas réactionnels ont-ils été proposés pour expliquer le mécanisme de la réaction. On les trouvera résumés dans la these de Breton [7] ainsi que dans la revue générale plus récente de McCaldin [22].

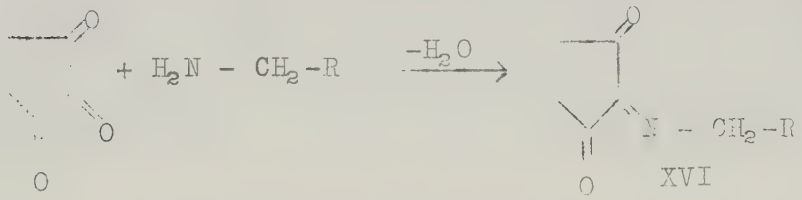
La formation des composés les plus importants : pourpre de Ruhemann, aldéhyde en C_{n-1} et gaz carbonique (dans le cas d'un aminoacide)

est bien élucidée par les suites de réactions proposées simultanément par Neuzil et coll. [39] et par McCaldin [22], théories très voisines qui font appel toutes deux à des mécanismes électroniques.

b) Mécanisme de Neuzil et al.

Le mécanisme avancé par Neuzil, Breton et Plagnol est basé sur une série de réactions successives. Nous l'examinerons tout d'abord dans le cas des amines primaires ne comportant aucun autre groupement fonctionnel supplémentaire dans leur molécule.

Dans un premier stade se forme une cétimine (XVI) :



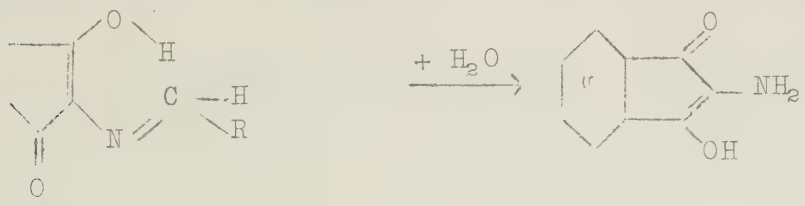
XVI

(La formule de la ninhydrine a été limitée ici à la seule partie carbonylée.)

qu'un transfert circulaire électronique à six sommets transforme en une aldimine (XVII) (2ème stade réactionnel) :

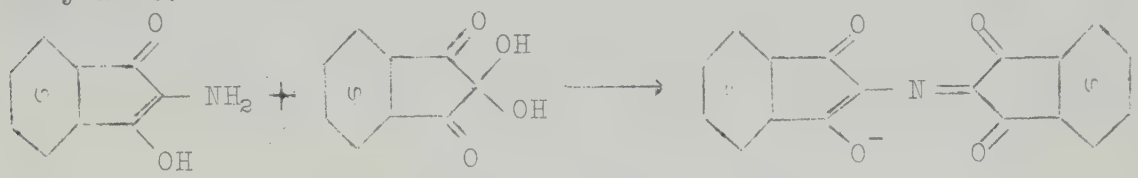
XVII

La troisième étape de la réaction consiste en l'hydrolyse de l'aldimine (XVII) avec apparition de l'amino-2-indanedione-1,3 (XVIII) présente sous la forme énolique ; au cours de cette hydrolyse la partie carbonée de l'ancienne amine se trouve libérée et donne naissance à l'aldéhyde en C_n :



XVII XVIII

Enfin le stade terminal est constitué par la synthèse du pourpre de Ruhemann par action de l'amino-dione indanique sur une nouvelle molécule de ninhydrine.



XVIII I XII

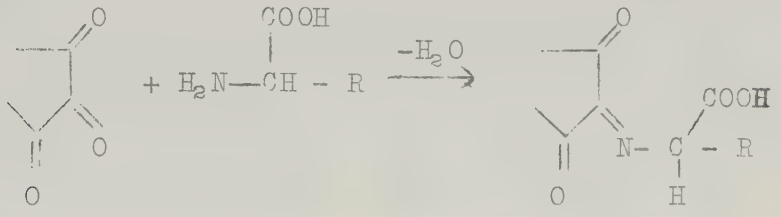
Un stade capital de cette réaction apparaît donc constitué par la transformation de la cétimine en une aldimine. Le mécanisme de prototropie invoqué implique la rupture de la liaison C-H : le départ de l'atome d'hydrogène sera, dans ces conditions, favorisé par toutes les circonstances donnant le phénomène d'hyperconjugaison. C'est ce qui se produit en particulier lorsque le radical R est constitué par un noyau benzénique (cas des benzylamines) : on observe alors effectivement une réaction particulière de ce type d'amines aromatiques, surtout lorsqu'on les compare aux amines de type $C_6H_5-(CH_2)_n-CH_2-NH_2$ dans lesquelles l'hyperconjugaison est beaucoup plus faible. Le départ de l'hydrogène par hyperconjugaison s'effectue beaucoup plus facilement aux dépens d'un groupement méthylénique $-CH_2-$ qu'aux dépens d'un groupement $-\underset{\displaystyle R}{\overset{\displaystyle |}{CH}}-$ dans lequel l'atome de carbone n'est lié qu'à un seul atome d'hydrogène. Aussi, dans les conditions particulièrement douces adoptées par Neuzil et coll. [37] pour l'examen de la réactivité des composés aminés avec la ninhydrine, les amines de type $(R,R')CH-NH_2$ ne donnent-elles pas lieu au développement de la réaction colorée ; toutefois, cette dernière se produit à la suite d'un effet photochimique qui fera l'objet de notre étude.

c) Cas des acides aminés

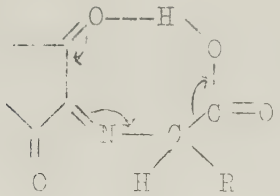
C'est surtout la réaction colorée intense que donne la ninhydrine avec les acides α-aminés qui est responsable de la grande diffusion de cette substance dans les laboratoires. Les aminoacides entrent cependant dans le groupe des amines du type $(R,R')CH-NH_2$ dont nous avons signalé l'absence de réactivité. Mais un phénomène nouveau intervient ici,

la possibilité pour un des groupements R ou R' de fournir très facilement un proton.

On peut donc, avec Neuzil et coll. [39], envisager pour les acides α-aminés la suite de réactinns ci-dessous. Soulignons que le milieu contient de l'alcool butylique tertiaire dont les solutions aqueuses ont une constante diélectrique basse. Ici encore, la première étape consiste en la formation d'une cétimine (XIX) favorisée par l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire, qui confère à cette cétimine une forme pseudocyclique (XX).

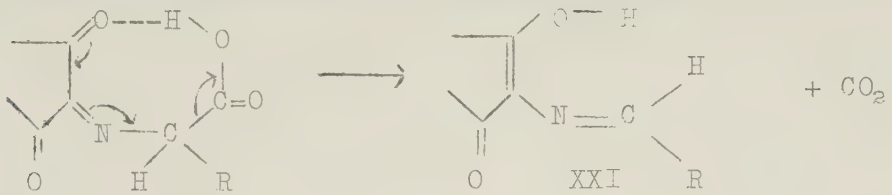


XIX



XX

Un transfert circulaire électronique conduisant à l'aldimine (XXI) se produisait ensuite comme précédemment. Ce transfert met toutefois en jeu huit sommets, et cette réaction de prototropie entraîne la décarboxylation de l'ancien aminoacide.

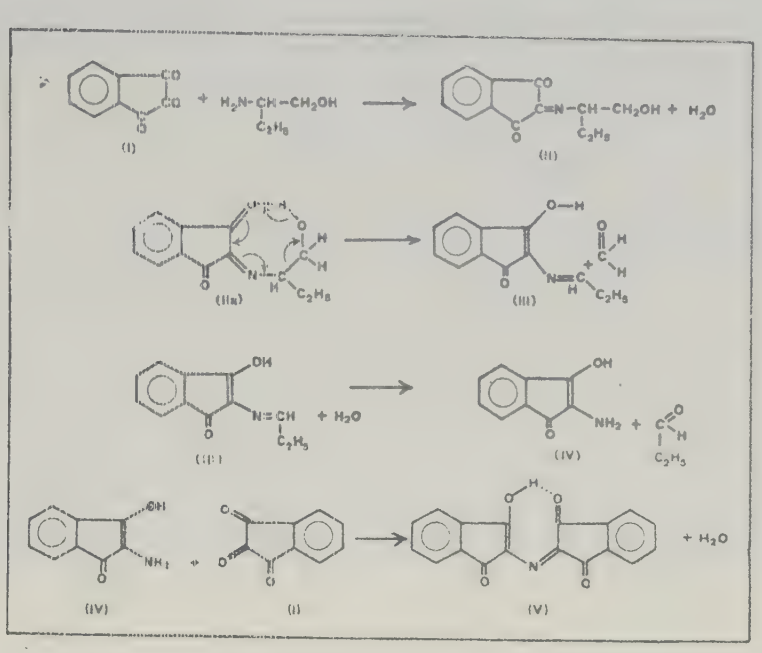


XX XXI

Les troisième et quatrième stades seraient identiques à ce que l'on observe pour les amines : hydrolyse de l'aldimine et formation du pourpre de Ruhemann par action de l'aminoindanedione sur la ninhydrine.

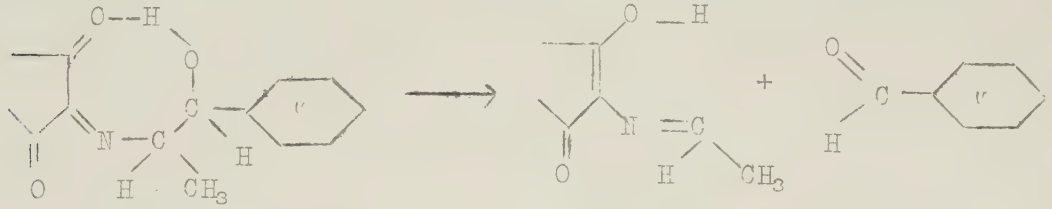
Le mécanisme ci-dessus présente le mérite d'expliquer la réaction de la ninhydrine avec d'autres variétés de composés aminés. Les

alcools primaires α-aminés, notamment, donneraient lieu aux réactions suivantes, que nous avons détaillées dans le cas de l'amino-2-butanol-1.



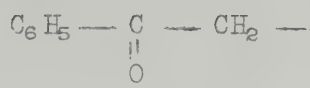
Ce schéma implique la libération de formaldéhyde, ce qui a été vérifié expérimentalement [51, 54].

Avec un aminoalcool de type R-CHOH-CH-R', comme par exemple la noréphédrine, le même schéma conduit à la formation de benzaldéhyde et d'acétaldéhyde, identifiés effectivement dans le milieu réactionnel [54].

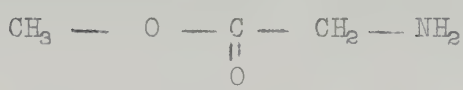


d) Réactions atypiques

L'interprétation de la réaction colorée de la ninhydrine avec les composés aminés, fondée sur l'existence de réactions successives, permet également de rendre compte des colorations atypiques observées avec quelques produits aminés particuliers. Il en est ainsi des amines α-cétoniques du type R-CO-CH_2-NH_2 et notamment des composés suivants :



phénylacylamine

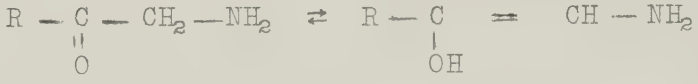


glycocollate de méthyle

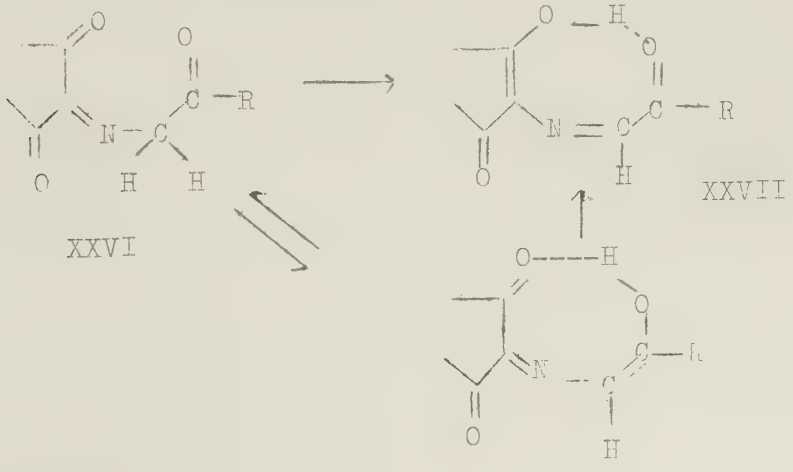
glycinamide

Ces composés, en effet, mis en présence de ninhydrine, conduisent à la formation initiale d'une coloration jaune ; ce n'est que très tardivement que le milieu réactionnel vire au brun-violet et qu'une chromatographie effectuée à ce moment là montre la présence du pourpre de Ruhemann.

On peut interpréter la formation du produit jaune par le blocage de la réaction aux stades de cétimine et d'aldimine. En effet les amines α-cétoniques subissent l'énolisation :



La forme cétonique de l'amine conduit à la formation de la cétimine qui se transforme, après attaque du groupement carbonylé par un proton cédé par le groupement méthylénique, en l'aldimine cyclique chélatée (XXVII). Avec la forme énolique, la cétimine initiale présente déjà une structure cyclique stabilisée par une liaison hydrogène (XXVIII) ; le passage à l'aldimine s'effectuerait également dans ce cas par attaque du groupement carbonylé voisin, avec cette différence que le proton proviendrait ici de l'hydroxyle énolique.



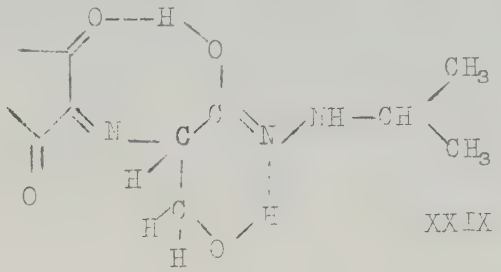
XXVI

XXVII

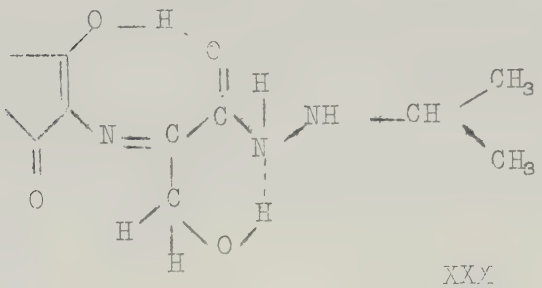
XXVIII

Formes chélatées stabilisées

Un mécanisme analogue peut être invoqué pour expliquer la coloration jaune fournie par la N-isopropyl-N-sérinyl-hydrazine, qui conduit aux cétimines cycliques doublement chélatées (XXIX et XXX).

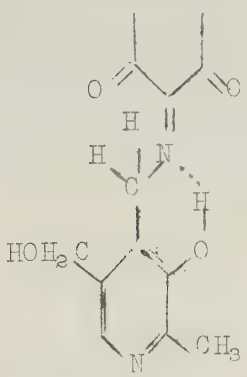


XXIX

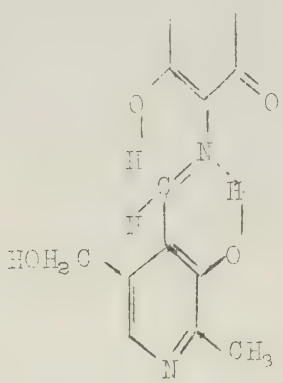


XXX

La coloration orangée donnée par la pyridoxamine correspond à un produit cristallisable [38] pour lequel on peut proposer les structures chélatées XXXI et XXXII.



XXXI



XXXII

Le blocage de la réaction aux stades de cétimine et d'aldimine n'est d'ailleurs pas absolu puisque, comme nous l'avons signalé, une petite quantité de pourpre de Ruhemann se forme tardivement.

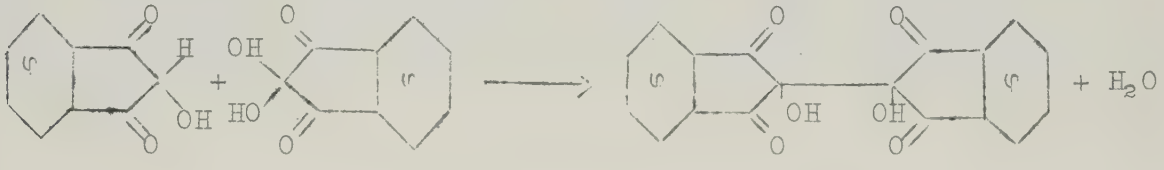
e) Formation des autres produits

Le mécanisme proposé par Neuzil et coll. [39] ne correspondrait toutefois qu'a l'une des voies réactionnelles possibles. La formation au cours de la réaction de l'hydroxy-2-indanedione-1,3 (XXXIII) ou de sa forme tautomérique représentée par le dihydroxy-1,2-indénone-3 (XXXIV)

XXXIII XXXIV

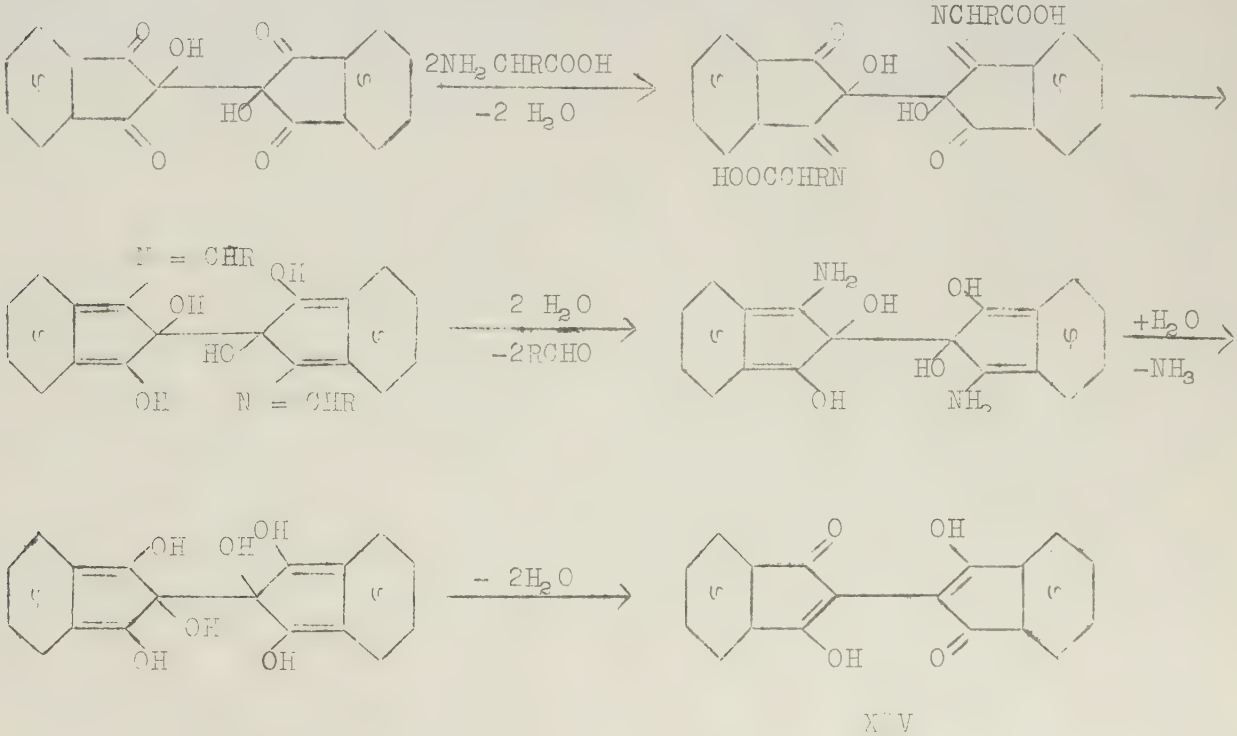
permet également de comprendre :

1)- la formation d'hydrindantine [63](XIII)



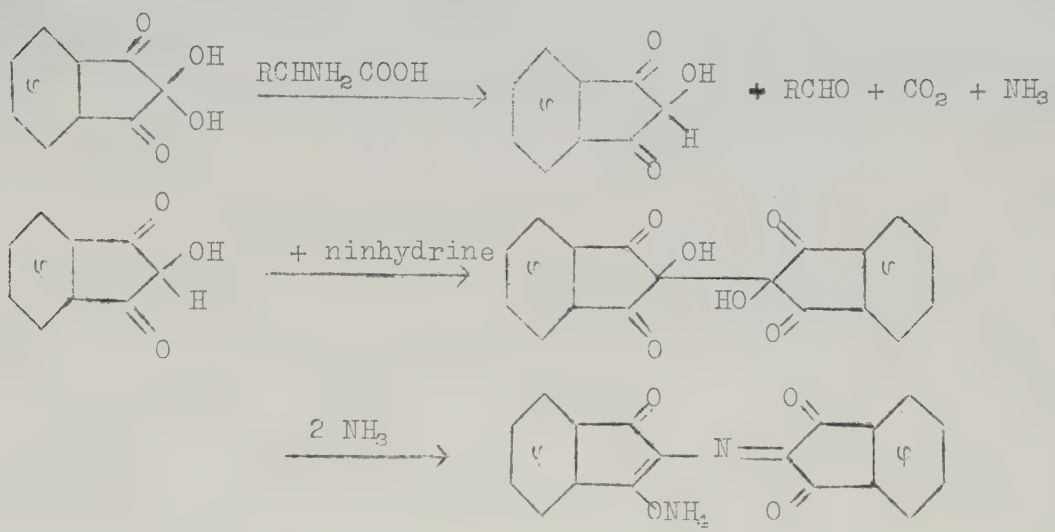
XIII

2)- la formation secondaire du bis-dicétoindanyle (XIV), selon les réactions ci-dessous invoquées par Moubasher et Ibrahim [30]



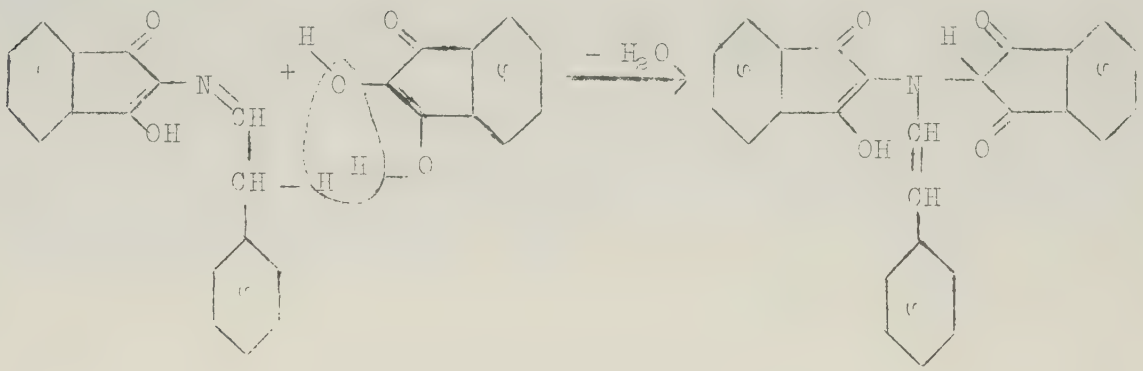
XIV

3)- la formation de pourpre de Ruhemann (XII) a partir de l'hydrindantine [63]



XII

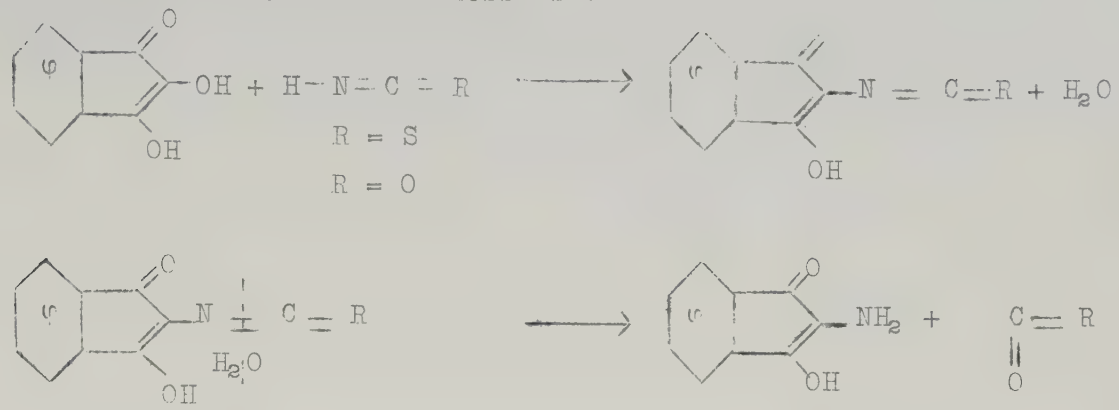
4)- la formation du colorant bleu avec la phénylalanine et les composés apparentés [20].



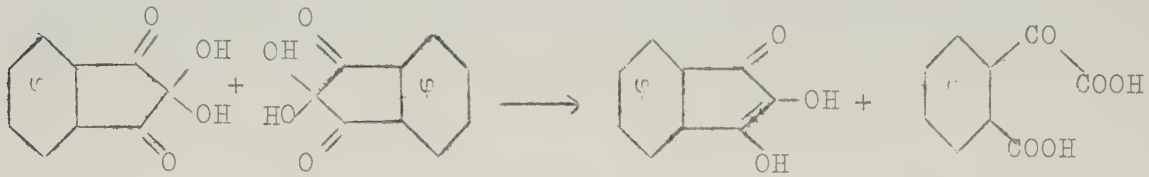
L'importance de l'hydroxy-2-indanedione-1,3 (XXXIII), composé qui peut être considéré aussi bien comme un produit de réduction de la ninhydrine, un produit d'hydrolyse de l'hydrindantine ou même un produit d'hydrolyse de l'amino-2-indanedione-1,3, semble confirmée par l'amélioration qu'amène dans les techniques de dosage des acides aminés par la ninhydrine l'introduction d'un agent réducteur (chlorure stanneux [29], cyanure de potassium [71] ou encore d'hydrindantine [12], par exemple).

L'apparition inattendue de pourpre de Ruhemann par action de la ninhydrine sur le thiocyanate de potassium ou le cyanate de potassium

[44, 45] s'explique également par la formation de la dihydroxy-1,2-indénone selon les réaction ci-dessous :



La dihydroxy-1,2-indénone proviendrait d'une réaction d'oxydoréduction de la ninhydrine, avec production d'acide phtalonique (XXXV) qui a été carac-



XXXV

térisé dans le milieu. Cette réaction d'oxydo-réduction est par ailleurs catalysée par les ions cyanure [9].

* * *

D E U X I E M E P A R T I E

-. TRAVAUX PERSONNELS .-

* * * * *

C H A P I T R E I

-:-:-:-:-:-:-:-

I - EXPOSE DU PROBLEME ETUDIE

Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'hydrate d'indanetrione-1,2,3, en solution aqueuse, réagit à chaud avec les composés aminés, en donnant une coloration bleu-violacé due à la formation de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine, encore appelée pourpre de Ruhemann.

En pratique cette réaction est couramment employée pour mettre en évidence la présence de composés aminés. La ninhydrine est ainsi un réactif de choix, utilisé pour cette caractérisation : de là découle son importance pratique.

L'addition de divers alcools au milieu favorise considérablement cette réaction colorée. Meyer [27], dès 1957, montre que la coloration bleu-violacé, obtenue au cours de la réaction de la ninhydrine avec l'alanine, augmente d'une manière linéaire en fonction de la concentration en éthanol du milieu réactionnel. Une étude plus complète de l'action des alcools a été réalisée par Neuzil, Breton et Plagnol [36, 39, 40]. Ces chercheurs ont montré que les différentes classes d'alcools ne possédaient pas la même influence, l'action favorisante des alcools primaires étant inférieure à celle des alcools secondaires. Le triméthylcarbinol, alcool tertiaire hydrosoluble, occupe une place tout à fait particulière : dans un milieu contenant 75 % en volume de ce composé, la réaction entre la ninhydrine et les acides aminés conduit, à la température du laboratoire et pour des quantités assez faibles des réactifs mis en présence, à une formation importante de pourpre de Ruhemann. Neuzil et coll. ont mis à profit ce phénomène pour effectuer une étude tres détaillée des facteurs structuraux qui, dans la molécule d'un composé aminé, conditionnent sa réactivité avec la ninhydrine [37, 38] . Ils confirmerent ainsi que, d'une maniere générale, les aminoacides réagissaient mieux que les simples ami-

nes. Dans ce dernier groupe de composés -et dans les conditions expérimentales particulierement douces utilisées- seules les amines de structure $R-CH_2-NH_2$ conduisent a la formation de pourpre de Ruhemann ; au contraire les amines de type $(R,R')\ CH-NH_2$, molécules dont l'atome de carbone porteur de la fonction aminée n'est relié qu'a un seul atome d'hydrogene, ne donnent lieu dans ces conditions a aucune coloration, même apres plusieurs jours de contact a l'obscurité.

Neuzil, Josselin et Breton [42] ont eu la surprise de constater que de tels mélanges réactionnels, lorsqu'ils étaient soumis à l'action de la lumière du jour après plusieurs heures de séjour à l'obscurité, se coloraient rapidement en bleu-violacé : il existe donc une voie photochimique de formation du pourpre de Ruhemann. La réaction photochimique de la ninhydrine avec la cyclohexylamine, amine à laquelle on peut aussi conférer la structure générale $(R,R')CH-NH_2$, a fait l'objet d'une brève mention de Mizell et Simpson [28],(quelques mois avant la communication de Neuzil et coll).Ces auteurs proposent une nouvelle séparation chroma-

cyclohexylamine

tographique des aminoacides, dans laquelle ils utilisent la cyclohexylamine, comme l'avaient fait avant eux Hardy et coll. [16] : en effet, en présence de cyclohexylamine, la révélation des aminoacides par la ninhydrine conduit à des taches de colorations plus variées que celles obtenues lorsqu'on met en oeuvre la seule tricétone. Mizell et coll. notent "que si le chromatogramme complètement révélé est exposé à une forte lumière pendant une longue période, une légère teinte bleue se développe sur le fond du papier". Ces auteurs, recherchant simplement l'amélioration de leurs chromatogrammes, ne semblent cependant pas avoir pressenti tout l'intérêt théorique et pratique de leur constation. C'est l'ensemble de ces phénomènes encore mal connus dont nous avons entrepris l'étude détaillée.

II-CONDITIONS OPERATOIRES STANDARDS

Pour un grand nombre de nos essais expérimentaux, nous avons adopté les concentrations en agents réactifs initialement utilisées par Neuzil et coll. [42] ; nous dissolvons le composé aminé et la ninhydrine dans un mélange d'eau et d'alcool butylique tertiaire, en présence d'un tampon phosphate, pour aboutir aux concentrations finales ci-dessous :

Concentration en ninhydrine	3,125	µmole/ml
" en amine	1,5625	"
" en $H_2K\,PO_4$	8,33	"
" en $HNa_2\,PO_4$	8,33	"
" en alcool butylique tertiaire	75	%(v/v)

Notons que la concentration en ninhydrine est deux fois plus élevée que celle de l'amine, puisqu'il faut au moins deux restants indaniques pour former une molécule de pourpre de Ruhemann à partir d'un seul atome d'azote.

Ce mélange réactionnel est maintenu à l'obscurité pendant 24 heures à une température constante qui, dans la majorité de nos expériences, est de 21°C.

La réalisation pratique de ce milieu est effectuée en mélangeant les deux solutions ci-dessous :

- Solution d'amine (12,5 µmole/ml) dans un tampon phosphate (H_2KPO_4, M/15 ; HNa_2PO_4, M/15)..... 2 ml
- Solution de ninhydrine (3,57 µmole/ml) dans un mélange eau-tert-butanol (1 : 6, vol/vol) ..... 14 ml

Il nous a semblé en effet inutile de reprendre le protocole décrit par Plagnol [55] pour l'étude de la réactivité des aminoacides, protocole où la réaction colorée était déclenchée par le mélange d'une solution d'aminoacide et d'une solution de ninhydrine, possédant toutes deux la même concentration en alcool butylique tertiaire pour éviter tout échauffement au moment de la réalisation du mélange. En effet, les subs-

tances que nous étudions ne sont pas directement réactives, et le léger échauffement qui se produit immédiatement apres l'addition à la solution de ninhydrine dans l'alcool butylique tertiaire de la solution aqueuse du composé aminé ne présente aucune importance, la température s'égalisant rapidement.

Après l'incubation à l'obscurité, nous procédons à l'irradiation des mélanges réactionnels dans une cuve thermostatique transparente maintenue à 21°C. Cette cuve est constituée par un bac de dimension 24 x 15 x 9 cm dans lequel on réalise une circulation d'eau grâce à une pompe thermostatique Thermomix (*) . Les mélanges réactionnels contenus dans des cuves de mesure a faces paralleles de 1 cm d'épaisseur sont placés dans le bac a température constante (figure 2).

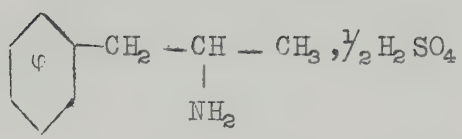
Bien que la solution soit initialement parfaitement transparente a l'oeil, l'irradiation proprement dite est réalisée avec une lampe à filament de tungstène, la faible fraction d'ultra-violet étant apparemment suffisante pour provoquer la réaction. Nous avons utilisé successivement une lampe de 500 w, puis une lampe du même type mais de puissance plus faible (300 w). Dans tous les cas, la distance entre source lumineuse et cellules a été fixée à 40 cm.

Après irradiation, la densité optique des mélanges est mesurée avec un spectrophotometre Unicam SP 500, à la longueur d'onde de λ= 570 nm, valeur correspondant à l'un des maximums d'absorption du pourpre de Ruhemann.

Afin d'éliminer les variations provenant de légeres différences dans les conditions d'irradiation, les mesures, au cours de chaque manipulation, ont été effectuées par comparaison a une même amine de référence servant d'étalon interne. Nous avons utilisé pour cela le sulfate de phényl-1-amino-2-propane (**) :

(*) Etablissement Roucaire.

(**)Cette amine nous a été aimablement fournie par les Laboratoires Spécia qui la commercialisent sous le nom d'ortédrine. Elle est aussi appelée amphétamine.



Les résultats seront ainsi exprimés en pourcentage, dans les conditions du protocole décrit ci-dessous : le mélange est maintenu à l'obscurité pendant 24 heures a la température de 21°C ; la durée de l'irradiation est de 30 minutes (lampe de 500 W) ou de 50 minutes (lampe de 300 W); la valeur 100 est attribuée à l'amine de référence. Nous verrons plus loin (voir p. 25) la raison du choix des temps d'irradiation.

C H A P I T R E II

-:-:-:-:-:-:-:-:-

Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la Ninhydrine.

Nous avons groupé la majeure partie de nos résultats expérimentaux dans les chapîtres II et III. Dans ce chapitre II, nous avons limité notre étude à une seule amine, le sulfate de phényl-1-amino-2-propane, en faisant varier, dans une série d'expériences, les différents paramètres influençant la réaction. Nous examinerons successivement les points suivants :

I - Influence du temps d'irradiation,

II - Influence de la concentration en phényl-1-amino-2-propane et en ninhydrine,

III - Rendement en pourpre de Ruhemann,

IV - Influence du temps de contact et de la température d'incubation à l'obscurité,

V - Influence de la nature et de la concentration en alcool,

VI - Influence de la concentration en sels,

VII - Spécificité d'action de la ninhydrine.

Le chapître III sera consacré à l'étude des différentes amines du type $(R,R')CH-NH_2$.

I-INFLUENCE DU TEMPS D'IRRADIATION

Cette étude a été effectuée avec l'appareillage indiqué ci-dessus, donc en lumiere blanche .

La courbe de la figure 3 nous montre que la synthèse du pourpre de Ruhemann est rapide au début de l'irradiation, puis la courbe s'infléchit et la formation du composé coloré est moins importante. Toutefois, la production du pourpre de Ruhemann est encore bien visible, même après 7 heures d'irradiation.

Le pourpre de Ruhemann se forme exclusivement pendant la période d'irradiation ; si l'on cesse cette dernière, la densité optique à λ = 570 nm reste stationnaire. Elle est inchangée, même au bout de 24 heures, si le mélange est maintenu à l'obscurité après l'irradiation. Une nouvelle irradiation s'accompagne d'une nouvelle formation de pourpre de Ruhemann. Ceci est bien illustré par la figure 4, où l'on constate que l'arrêt de l'irradiation a simplement entraîné un décalage dans le temps de la courbe de production du pourpre de Ruhemann.

Nous avons signalé plus haut que nous avions été amené à effectuer les irradiations nécessaires à notre travail avec deux sources lumineuses d'intensité différente. Bien entendu, le développement de la coloration violette est moins rapide avec une lampe de 300 W qu'avec celle de 500 W. Nous avons constaté que la valeur de la densité optique obtenue après 30 mn d'irradiation avec la lampe de 500 W pouvait être également atteinte avec la lampe de 300 W en prolongeant le temps d'irradiation de 20 mn (soit 50 mn au total).

Si l'on exprime les résultats en pourcentage de la densité optique des deux témoins internes :

- l'un correspondant a 30 mn d'irradiation avec la lampe de 500 W
- l'autre correspondant a 50 mn d'irradiation avec la lampe de 300 W

les deux courbes cinétiques obtenues sont absolument superposables.

Au cours de l'étude de l'influence du temps d'irradiation nous avons recherché si la réaction photochimique obéissait à un ordre par rapport au nombre de photons absorbés. Dans ce but, nous avons effectué une série d'expériences au Laboratoire de Chimie Physique de la

Faculté des Sciences. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Monsieur Faure. L'appareil utilisé est schématisé sur la figure 5.

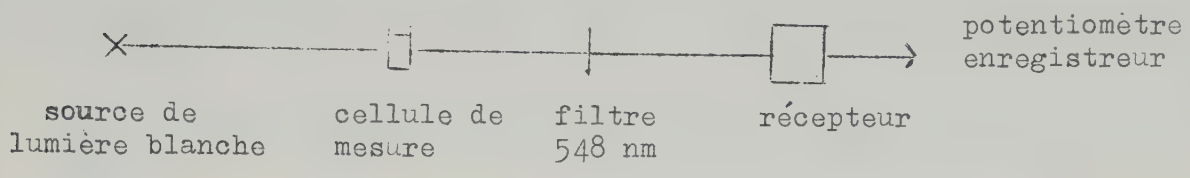


Figure 5.
Schéma de l'appareil.

Les solutions irradiées ont été préparées selon le protocole indiqué page 21. La figure 6 montre la courbe obtenue. Dans différents essais nous avons fait varier les concentrations en ninhydrine et en phényl-1-amino-2-propane, l'allure générale des courbes tracées est similaire. Si la vitesse de formation du pourpre de Ruhemann obéit à un ordre par rapport au nombre de photons absorbés, on peut écrire :

$$V = \frac{dC}{dt} = k \quad I_{abs}^{n}$$

$$d = \log \frac{I_o}{I}$$

$$I = I_o \, e^{-2,3d}$$

$$I_{abs} = I_o - I$$

$$I_{abs} = I_o(1-e^{-2,3d})$$

$$\frac{dC}{dt} = kI_o^n \, (1-e^{-2,3d})^n$$

C concentration du pourpre de Ruhemann formé.

I_o intensité lumineuse incidente

I intensité lumineuse après traversée de la cuve de mesure.

d densité optique.

ε coefficient d'extinction moléculaire.

mais $d = \epsilon C l$

$$\frac{d\,(d)}{(1-e^{-2,3d})^n} = k\epsilon l I_o \, dt$$

$$\int \frac{d(d)}{(1-e^{-2,3d})^n} = k\epsilon \, l I_o^n \quad t + cte = at + b$$

En représentant l'intégrale du membre de gauche en fonction de t on devrait donc obtenir une droite. Nous avons essayé toutes les valeurs entières et demi-entières de n entre 1:2 et 3 sans succés. Cette réaction ne présente donc pas un ordre simple par rapport au nombre de photons absorbés.

II -INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PHENYL-1-AMINO-2-PROPANE ET EN NINHYDRINE

Cette étude a également été réalisée au Laboratoire de Chimie Physique avec l'appareil décrit p. 26. Nous avons fait varier les concentrations en ninhydrine et en phényl-1-amino-2-propane dans les limites suivantes :

Essai n°	C^n en ninhydrine, en µmole/ml	C^n en phényl-1-amino-2-propane en µmole/ml
1	0,7812	0,3906
2	0,7812	0,7812
3	0,7812	1,5625
4	0,7812	2,3437
5	0,7812	3,1250
6	1,5625	0,3906
7	1,5625	0,7812
8	1,5625	1,5625
9	1,5625	2,3437
10	1,5625	3,1250
11	3,1250	0,3906
12	3,1250	0,7812
13	3,1250	1,5625
14	3,1250	2,3437
15	3,1250	3,1250
16	6,2500	0,3906
17	6,2500	0,7812
18	6,2500	1,5625
19	6,2500	2,3437
20	6,2500	3,1250
21	9,3750	0,3906
22	9,3750	0,7812
23	9,3750	1,5625
24	9,3750	2,3437
25	9,3750	3,1250

Nous avons recherché l'ordre de la réaction photochimique par rapport aux deux espèces chimiques : ninhydrine et phényl-1-amino-2-propane. A cet effet nous avons utilisé la méthode des vitesses initiales proposée par Letort [21]. Nous avons mesuré la pente à l'origine de la courbe d = f(t) ; puis nous avons porté sur un graphique le logarithme de cette quantité en fonction du logarithme de la concentration de l'espèce étudiée. Si la réaction obéit a un ordre, cette représentation conduit à une droite dont la pente est numériquement égale à cet odre. Compte tenu de l'imprécision importante dont est entachée la détermination de la tangente à l'origine, nous avons effectué de nombreuses mesures et opéré sur les valeurs moyennes. Les résultats rassemblés sur la figure 7 mettent en évidence un ordre égal à 0,7 par rapport à la ninhydrine et à 0,8 par rapport au phényl-1-amino-2-propane.

III-RENDEMENT EN POURPRE DE RUHEMANN

Le coefficient d'extinction moléculaire du pourpre de Ruhemann a été déterminé par Meyer [27] : une solution renfermant 9,2 mg/l de ce produit (soit 30,34 µmole/l), examinée en cuve de 1 cm d'épaisseur, présente à λ = 578 nm une densité optique de 0,6.

Dans les conditions d'étude de notre témoin interne, la densité optique mesurée après 30 mn d'irradiation est de 0,570 (cuves de 1cm) ; elle correspond donc à une concentration en pourpre de Ruhemann de:

$$\frac{0{,}03034 \times 0{,}570}{0{,}600} = 0{,}0288 \text{ µmole/ml}$$

de pourpre de Ruhemann. La quantité de pourpre de Ruhemann maximale, correspondant à un rendement de 100 %, est de 1,5625 µmole/ml, concentration du composé mis en oeuvre. Après 30 minutes d'irradiation, le rendement en pourpre de Ruhemann est donc

$$\frac{0{,}0288}{1{,}5625} = 1{,}8\ \%.$$

Dans nos conditions opératoires, l'interaction entre le phényl-1-amino-2-propane et la ninhydrine ne conduit qu'à un rendement en pourpre de Ruhemann très faible : la réaction est très loin d'être totale.

IV - INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION A L'OBSCURITE

Si l'on réalise le mélange réactionnel décrit précédemment (voir p. 21) et si on le soumet immédiatement à l'action de la lumiere, on n'observe pas de formation de pourpre de Ruhemann lorsque l'irradiation reste inférieure à 30 minutes (lampe de 500 W). La réaction colorée caractéristique ne se produit qu'après une incubation préalable à l'obscurité dont nous avons étudié deux aspects :

- la durée,
- la température.

Dans différentes expériences, nous avons fait varier la durée d'incubation de 1 à 48 heures ; les mélanges réactionnels ont été conservés aux températures de 20, 40, 60 et 80°C à l'aide d'un bain thermostaté. Après une durée de séjour déterminée à l'une de ces températures, le mélange est introduit dans une cuve à faces parallèles et irradié dans nos conditions standards (lampe de 500 W ; 30 mn d'irradiation à la température de 21°C). Les valeurs de la densité optique sont données, comme dans nos autres expériences, par comparaison avec notre étalon interne (incubation de 24h à 21°C).

Résultats :

Nous avons tout d'abord constaté que quelles que soient les conditions choisies il n'y a pas au cours de l'incubation apparition de pourpre de Ruhemann : la densité optique à λ = 570 nm reste nulle à la fin de la période d'incubation obscure dans toutes ces expériences. La formation du pourpre de Ruhemann est donc réellement un phénomène photochimique tout au moins dans nos conditions de travail. Ceci mérite d'être souligné, car le phényl-1-amino-2-propane peut être révélé par la ninhydrine en chromatographie sur papier lorsque le chromatogramme, après pulvérisation du réactif, est chauffé à l'étuve a température élevée (110°C).

Nos résultats sont groupés sur les courbes de la figure 8.

A la température du laboratoire, la quantité de pourpre de Ruhemann formé augmente avec la durée de l'incubation : la courbe cinétique s'infléchit toutefois rapidement et un plateau peut être noté à partir de la 20e heure. C'est pourquoi nous avons adopté un temps d'incubation de 24 heures pour notre témoin interne ainsi que pour les expériences effectuées avec d'autres composés aminés (ch. III).
L'incubation à la température de 40°C s'accompagne d'une formation beaucoup plus importante de pourpre de Ruhemann. L'influence du temps d'incubation reste cependant très comparable puisque l'on note également l'existence d'un plateau, qui débute toutefois vers la 8e heure.

Pour des températures supérieures, la prolongation du temps d'incubation ne se montre plus favorable, le rendement en pourpre de Ruhemann diminuant légèrement lorsque l'incubation dépasse 4 heures à 60°C. Le même phénomene, encore plus marqué, s'observe pour les expériences effectuées à 80°C.

Au cours de l'incubation se produit donc un premier phénomène qui constitue une étape indispensable avant la réaction photochimique. Cette étape est influencée, nous le voyons, par la température. La densité optique à λ = 570 nm obtenue au bout d'un temps d'incubation assez court (1h) est directement proportionnelle à la vitesse de ce phénomène. A l'aide d'un diagramme $\log d = f(1/T)$ nous pouvons donc rechercher si la loi d'Arrhénius est vérifiée et dans l'affirmative en déduire une énergie d'activation apparente. C'est ce que nous avons fait sur la figure 9.
On obtient une droite dans la représentation précédente, droite dont la pente correspond à une énergie d'activation de 12,5 kcal/mole.

Les valeurs indiquées ci-dessus ne sont évidemment valables que si tous les constituants du mélange réactionnel sont présents au moment de l'incubation. Si l'incubation s'effectue sans la présence de tert-butanol, de phosphates, de ninhydrine ou de phényl-1-amino-2-propane, le constituant manquant étant introduit immédiatement avant de procéder à l'irradiation, la quantité de pourpre de Ruhemann formée est nettement plus faible (tableau II).

TABLEAU II

Influence de la constitution du milieu réactionnel soumis à l'incubation à l'obscurité.
(concentrations finales de la p. 21)

Constituants présents pendant l'incubation	Constituant ajouté avant l'irradiation	Densité optique après 1h d'irradiation
Mélange complet	0	0,570
Phényl-1-amino-2-propane + ninhydrine	tert-butanol + phosphates	0,070
Phényl-1-amino-2-propane + ninhydrine + phosphates	tert-butanol	0,110
Phényl-1-amino-2-propane + ninhydrine + tert-butanol	phosphates	0,120
Phényl-1-amino-2-propane + phosphates + tert-butanol	ninhydrine	0,180
Ninhydrine + phosphates + tert-butanol.	phényl-1-amino-2-propane	0,080

V - INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA CONCENTRATION EN ALCOOL

La réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine a été examinée jusqu'ici en présence d'alcool butylique tertiaire, dont la concentration dans le milieu réactionnel est de 75 % (vol/vol). Nous avons tout d'abord recherché si l'alcool butylique tertiaire jouait un rôle pendant l'incubation.

Nous avons réalisé deux expériences :

a) la premiere, qui constitue le témoin, est effectuée dans les conditions habituelles : pendant l'incubation de 24 heures, ninhydrine, phényl-1-amino-2-propane, phosphates et alcool butylique tertiaire, sont en présence.

b) dans la deuxième, l'alcool butylique tertiaire, absent pendant la période d'incubation, est ajouté au mélange immédiatement avant l'irradiation.

Les deux mélanges réactionnels ainsi préparés ont donc finalement la même composition. On constate un retard considérable de la formation de pourpre de Ruhemann dans l'échantillon où l'incubation n'a pas mis en jeu d'alcool (figure 10).

Ceci met en évidence le rôle fondamental joué par l'alcool, dont la présence pendant la durée de l'incubation est indispensable pour que la réaction photochimique ait lieu ultérieurement. La faible quantité de pourpre de Ruhemann apparaissant dans le second cas peut s'expliquer aisément : au cours de l'irradiation tous les réactifs sont mélangés et les conditions de l'incubation se trouvent alors réunies.

Nous avons confirmé le rôle de l'alcool en réalisant une troisième série d'expériences dans lesquelles l'incubation et l'irradiation sont toutes deux effectuées en absence de ce réactif. Dans ces conditions il ne se forme aucune trace de pourpre de Ruhemann. Ceci nous amène a étudier l'influence de la concentration en tert-butanol (figure 11).

Nous constatons que le pourpre de Ruhemann n'apparaît que pour des concentrations en alcool butylique tertiaire supérieures à 45 % . Nous avons pu étudier l'influence de la concentration en alcool (c) entre 45 et 85 % ; la courbe représentative des variations de la densité optique (d) est une exponentielle :

$$d = Ke^{f(c)}$$

On obtient une relation tres voisine entre densité optique et concentration en tert-butanol au cours de l'étude de la réaction de la ninhydrine avec le glycocolle [7], réaction qui ne nécessite aucun apport photochimique.

L'alcool butylique tertiaire occupe une place tres particulière dans la série des alcools hydrosolubles. Nous avons, dans divers

essais, remplacé le tert-butanol par cinq autres alcools : seul l'isopropanol conduit a une formation importante de pourpre de Ruhemann (Tableau III et figure 11).

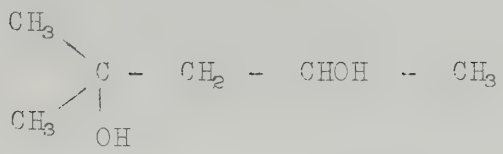
TABLEAU III

Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.

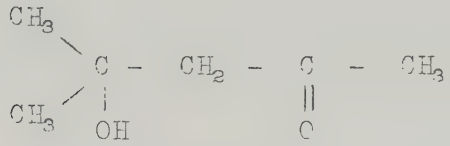
Concentrations habituelles en composé aminé, en phosphates et en ninhydrine.
Influence de la nature de l'alcool.
Incubation de 24h. 21°C ; irradiation de 50 mn (lampe de 300 W).

Alcool utilisé		Concentration finale en alcool en % (vol/vol)	Pourpre de Ruhemann formé en % par rapport à l'étalon interne
Alcools Primaires	méthanol	45	0
	éthanol	45	0
	n-propanol	75	0
Polyalcool Primaire	éthyl-2-hydroxyméthyl-2-propanediol-1,3	75	0
Alcool Secondaire	isopropanol	75	54
Alcool Tertiaire	tert-butanol	75	100

Nous avons voulu savoir si la fonction alcool tertiaire constituait par elle-même un facteur favorisant la réaction photochimique en étudiant les quatre composés ci-dessous, qui possèdent un ou plusieurs hydroxyles alcooliques tertiaires dans leur molécule :

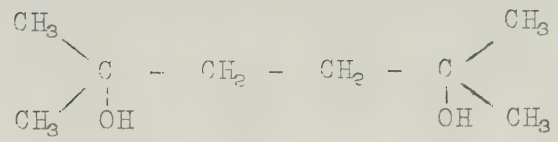


méthyl-2-pentanediol-2,4



diacétone alcool

pinacol



diméthyl-2,5-hexanediol-2,5

La plus faible solubilité dans l'eau de ces composés nous a amené à modifier notre protocole général :

- le méthyl-2-pentanediol-2,4 a été étudié à la concentration de 60%. Il conduit, dans ces conditions, à une faible production de pourpre de Ruhemann (12 % du témoin interne). Son produit d'oxydation, le diacétone alcool, dans les mêmes conditions opératoires, s'avère complètement négatif.

- pour les deux glycols tertiaires, nous avons adopté un protocole particulier :

a) la concentration finale en alcool est maintenue a 75%

b) l'incubation est réalisée à la température de 45°C ; en effet, le milieu n'est pas limpide à une température inférieure.

c) nous avons dû éliminer du milieu réactionnel les phosphates non solubles dans ces conditions ; aussi le sulfate d'amphétamine a-t-il été remplacé par la base, plus réactive (voir p. 38).

Malgré ces modifications, nous n'avons pu observer la moindre formation de pourpre de Ruhemann.

VI - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS

Les expériences relatées plus haut ont toutes été effectuées dans un milieu qui renferme des quantités équimoléculaires de phosphates monopotassique et disodique, la concentration finale de chacun de ces deux sels étant fixée à M/120 (soit 8,33 µmole/ml). Ces conditions, comme nous l'avons déjà rappelé, correspondent à celles qui avaient été sélectionnées précédemment [38, 42] pour l'étude comparative de la réactivité d'un grand nombre de composés aminés.

Nous examinerons successivement :

- l'influence de la concentration en phosphate,
- l'influence du pH du tampon phosphate utilisé,
- l'influence de différents anions.

Nous terminerons en comparant l'influence des sels sur diverses réactions entre la ninhydrine et différents composés aminés qui ne nécessitent pas un apport photochimique pour conduire au pourpre de Ruhemann.

1) - Influence de la concentration en phosphates

Nous avons réalisé une série d'essais dans lesquels les concentrations en phényl-1-amino-2-propane, en ninhydrine, en alcool butylique tertiaire et en eau sont celles indiquées page 21. Dans toutes ces expériences les quantités de phosphates monopotassique et disodique sont équimoléculaires ; nous avons fait varier la concentration en phosphate de 0 à 8,33 µmole /ml (concentration de chaque phosphate). Les résultats obtenus sont groupés dans la figure 12.

En l'absence de phosphate, le sulfate de phényl-1-amino-2-propane ne donne pratiquement pas lieu à la formation de pourpre de Ruhemann après une irradiation de trente minutes. Le pigment se manifeste tres nettement par l'adjonction au milieu de ces sels. Un optimum de rendement dans la réaction colorée se produit pour des quantités très faibles de phosphate, 0,833 µmole /ml (soit M/1200 pour chaque phosphate). Au-delà de cette concentration, la formation de pourpre de Ruhemann diminue progressivement ; pour l'optimum de concentration, le rendement en pourpre de Ruhemann est alors de 80 % supérieur à celui observé dans nos conditions habituelles. Il est impossible d'étudier des concentrations supérieures à M/120, qui ne permettent pas l'obtention d'un milieu réactionnel homogène en présence de tert-butanol.

Malgré l'existence de cet optimum, nous avons conservé, pour les expériences où nous comparons la réactivité de composés aminés de différentes structures, la concentration en phosphate de M/120 , car le pouvoir tampon de la solution aqueuse ainsi réalisée est nettement supérieur. D'autre part, nous avons tenu a nous rapprocher le plus possible d'un protocole qui a permis l'étude comparative de tres nombreuses substances à groupement $-NH_2$.

En l'absence de phosphate, le sulfate de phényl-1-amino-2-propane peut cependant conduire à la formation d'une petite quantité de pourpre de Ruhemann, si l'on prolonge l'irradiation. Dans l'expérience de la figure 12, on observe une densité optique de 0,05 (cuve de 1 cm) après deux heures d'irradiation.

2) - Influence du pH du tampon phosphate

Pour réaliser ces expériences, nous sommes parti de deux solutions de sulfate de phényl-1-amino-2-propane à la même concentration (12,5 µmole /ml) :

- l'une dans une solution de H_2KPO_4 , 8,33 µmole/ml
- l'autre dans une solution de HNa_2PO_4 , 8,33 µmole/ml

Ces deux solutions sont mélangées dans les proportions suivantes :

Tube n°	Solution acide	Solution alcaline	pH
1	2,00	0,00	4,53
2	1,75	0,25	5,94
3	1,50	0,50	6,32
4	1,25	0,75	6,47
5	1,00	1,00	6,80
6	0,75	1,25	6,91
7	0,50	1,50	7,21
8	0,25	1,75	7,48
9	0,00	2,00	8,89

On ajoute alors dans chaque tube une solution de ninhydrine dans un mélange eau-tert-butanol, de maniere à réaliser une concentration finale en alcool de 75 % ; les concentrations finales en phényl-1-amino-2-propane et en ninhydrine sont celles du protocole habituel.

Après 24 heures de séjour à l'obscurité et à la température du laboratoire, on procede à l'irradiation (50 mn, lampe de 300 W). Les résultats sont exprimés, comme d'habitude, en pourcentage par rapport au milieu renfermant des quantités équimoléculaires des deux phosphates (étalon interne). Dans la figure 13, nous les avons représentés en fonction du pH du milieu purement aqueux, en raison des difficultés à définir une valeur de pH lorsque le mélange renferme une grande quantité d'alcool butylique tertiaire.

Il apparaît que la réaction colorée, faible pour un pH inférieur a 6, augmente régulièrement d'intensité lorsque le pH du tampon passe de 6 à 7,5. Le tampon que nous utilisons dans la majorité de nos

expériences (pH = 6,8) permet toutefois une observation très facile de la réaction colorée.

Ces constatations sur l'influence du pH nous permettent d'interpréter nos précédents résultats relatifs à l'influence de la concentration en phosphate, dans les essais effectués avec le mélange équimoléculaire de H_2KPO_4 et de HNa_2PO_4. Nous avons en effet, dans les expériences correspondant à la figure 12, mesuré le pH du milieu réactionnel après l'incubation à l'obscurité et avant l'irradiation. Bien que la valeur du pH, dans de telles conditions opératoires, soit difficile à interpréter puisque le milieu renferme 75 % de tert-butanol, il convient de remarquer (figure 14) que l'on observe un maximum d'alcalinité dans le mélange correspondant à la concentration 0,833 µmole/ml de chaque phosphate.

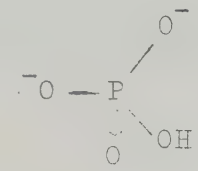
L'optimum de concentration en phosphate s'expliquerait ainsi par l'alcalinité plus grande du milieu réactionnel. D'ailleurs, à pH suffisamment élevé, le phényl-1-amino-2-propane conduit par voie photochimique à la formation du pourpre de Ruhemann en l'absence de phosphate. Nous avons en effet effectué une nouvelle expérience en adoptant le protocole de la page 21 ; toutefois on a ajouté à la solution aqueuse de sulfate de phényl-1-amino-2-propane la quantité de soude nécessaire pour neutraliser les ions sulfate du milieu. Après incubation de 24h à l'obscurité, le milieu reste incolore ; son "pH" (mesuré donc en présence de tert-butanol) est de 9,05. L'irradiation dans les conditions standards conduit à une densité optique qui est 2,8 fois supérieure à celle du témoin interne.

3) - Spécificité des phosphates : influence de divers anions

Nous venons de voir que la réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine peut s'effectuer en l'absence de phosphate si le milieu est suffisamment alcalin. La présence de phosphate favorise considérablement la réaction lorsque le "pH" du milieu réactionnel reste voisin de la neutralité. C'est donc dans ces

conditions limitatives que se pose le problème de la spécificité des phosphates. Nous avons étudié comparativement les composés ci-dessous à différentes concentrations :

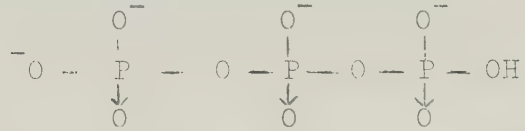
- l'ion orthophosphate :



Ces essais ont été effectués avec le mélange équimoléculaire de phosphates monopotassique et dissodique (pH = 6,8) ;

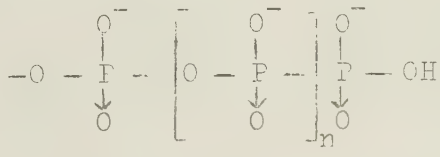
- l'ion pyrophosphate :

- le tripolyphosphate de sodium :



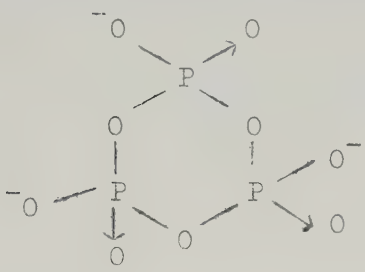
Pour ces deux derniers produits, le pH de la solution aqueuse a été préalablement ajustée à 6,8 , pour lequel la plus grande partie des sels en solution possèdent la configuration ionique indiquée. Les comparaisons sont effectuées pour des mélanges réactionnels contenant la même quantité de phosphore. La gamme de concentrations utilisable avec le pyrophosphate et le tripolyphosphate se trouve toutefois assez limitée par la faible solubilité de ces sels dans un milieu riche en tert-butanol. Les résultats ont été groupés dans la figure 12.
Il apparaît très nettement que le pyrophosphate possède une influence favorable sur la formation du pourpre de Ruhemann qui correspond très sensiblement à 50 p. 100 de l'orthophosphate. Le tripolyphosphate est encore moins actif (environ le tiers de l'activité de l'orthophosphate);

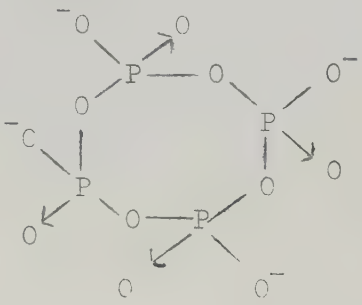
- le sel de Graham :



dont la molécule possède encore un groupement oxhydrile, étudié dans les mêmes conditions, ne manifeste qu'un effet très réduit sur la réaction colorée ;

- le trimétaphosphate et le tétramétaphosphate :





dans des expériences similaires, ont montré une influence encore plus faible (tableau IV), qui peut d'ailleurs s'interpréter par leur hydrolyse et la libération d'ions orthophosphate. .

TABLEAU IV

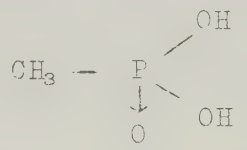
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.

Influence de divers composés phosphorés.

Concentration en P en $atgl^{-1}$	Sel de Graham	Trimétaphosphate	Tétraméta-phosphate
$8,3 \times 10^{-3}$	20,4		
$4,0 \times 10^{-3}$	18,8	16,4	16,5
$2,2 \times 10^{-3}$	13,3		
$1,6 \times 10^{-3}$		10,0	10,7
$0,8 \times 10^{-3}$	7,7	8,0	7,0
$0,4 \times 10^{-3}$		5,9	5,5

Nous avons pu étudier deux esters phosphoriques organiques, le β-glycérophosphate de sodium et le phényl-phosphate disodique. Ces composés ont été préalablement dissous en milieu aqueux et le pH de la solution amené à 6,8 . Examinés ensuite pour différentes valeurs de concentration, dans nos conditions habituelles, ils ont fourni les résultats indiqués dans la figure 15.

Les polyphosphates et les esters phosphoriques mentionnés ci-dessus constituent des produits facilement hydrolysables et qui libèrent des ions orthophosphate au cours de cette dégradation. Il nous a donc semblé intéressant d'effectuer quelques essais avec l'acide méthylphosphonique, composé caractérisé par la liaison de covalence extrêmement



faible C-P. L'acide méthylphosphonique, étudié dans les mêmes conditions expérimentales que les produits ci-dessus, favorise considérablement la réaction photochimique ; son action est même plus intense que celle des ions orthophosphate (figure 15).
Remarquons, ici encore, l'existence d'un optimum de concentration pour 4×10^{-3} atgl^{-1} de phosphore, optimum correspondant à une concentration supérieure à celle de l'optimum relevé pour les orthophosphates.

La parenté entre le phosphore et l'arsenic nous a conduit à réaliser quelques expériences complémentaires:

- l'ion arséniate, toujours examiné dans les mêmes conditions, présente une influence absolument analogue à celle des orthophosphates (figure 16) dans la gamme de concentrations où la comparaison est possible. Dans le domaine des composés arséniés, nous avons également examiné l'influence de l'acide monométhylarsonique, dont le sel de sodium est un médicament classique connu sous la dénomination usuelle d'arrhénal ; ce produit, ainsi que l'acide phénylarsonique, favorise le développement de la réaction photochimique. On n'observe pas toutefois l'existence d'un optimum très net pour les faibles concentrations (figure 17). L'analogie de comportement, si frappante entre les orthophosphates et les arséniates, apparaît au contraire moins manifeste lorsque l'on compare l'acide méthylphosphonique et son analogue arsénié.

- l'influence favorisante des phosphates et des arséniates n'est qu'un aspect d'un phénomène plus général ; le sel de l'acide propionique, les sels de diacides organiques, en particulier ceux de l'acide de malonique et de l'acide succinique (toujours étudiés sous forme d'une solution aqueuse à pH = 6,8) présentent une influence très comparable à celle des phosphates (figure 18).

4) - Influence des phosphates sur la formation de pourpre de Ruhemann à partir d'autres composés aminés

Nous avons voulu savoir si l'influence favorable des phosphates au cours de la réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane trouvait son parallèle dans d'autres réactions de la ninhydrine, et tout particulièrement avec les produits aminés qui conduisent à la formation de pourpre de Ruhemann sans intervention photochimique.

Nous avons sélectionné à cet effet les trois composés ci-dessous :

$CH_3 - CH_2 - NH_2$ éthylamine

$CH_3 - CH(CH_2OH) - NH_2$ amino-2-propanol-1 (alaninol)

$CH_3 - CH(COOH) - NH_2$ alanine

L'influence des phosphates sur le comportement de ces composés a été examinée successivement en présence de tert-butanol et en l'absence de cet alcool.

a) - Expériences en présence de tert-butanol

Nous avons réalisé les mélanges de composition finale ci-dessous :

éthylamine, HCl ..... 9,25 µmole./ml
ninhydrine ..... 18,25 " "
tert-butanol ..... 75 % (vol/vol)
solution d'acide phosphorique à diverses concentrations amenée à pH = 6,75 ..... 25 % (vol/vol)

Nous avons ensuite mesuré en fonction du temps la densité optique à λ= 570 nm, maximum d'absorption du pourpre de Ruhemann. Nous avons indiqué dans la figure 19 les résultats obtenus à la deuxième heure d'expérience.

La présence de phosphate favorise considérablement la formation du pourpre de Ruhemann ; ici encore, on note un optimum de concentration qui se produit pour 4,1 $atgl^{-1}$ de phosphore, c'est à dire une valeur assez nettement supérieure à celle notée pour les réaction photochimiques du sulfate de phényl-1-amino-2-propane (figure 12).

Le remplacement de l'éthylamine par l'alaninol montre que l'influence favorable des phosphates existe, mais qu'elle est nettement moins marquée avec l'amino-alcool qu'avec le composé monofonctionnel (figure 19).

Dans la réaction de l'alanine avec la ninhydrine étudiée selon les mêmes conditions opératoires, la solution de phosphate à pH = 6,75 ne montre qu'une influence tres réduite et pratiquement négligeable (tableau V)

TABLEAU V

Concentration en P en $atgl^{-1}$	Densité optique apres 15 mn
0	1,250
2×10^{-3}	1,680
$4,1 \times 10^{-3}$	1,775
$8,3 \times 10^{-3}$	1,930
16×10^{-3}	1,760
33×10^{-3}	1,900

b)- Expériences en milieu purement aqueux

La réactivité plus faible des composés aminés vis à vis de la ninhydrine en l'absence d'alcool butylique tertiaire nous a amené à éliminer l'éthylamine et l'alaninol de nos essais ; en effet, même aux concentrations de 27, 75 µmole/ml en composé aminé (donc avec une concentration double en ninhydrine), on n'observe aucune formation de pourpre de Ruhemann, en présence ou en l'absence de phosphates. L'aminoacide correspondant, l'alanine, substance plus réactive, a pu être étudié à la concentration du protocole de la page 43 . L'addition de phosphates au milieu réactionnel n'entraîne pas une formation plus grande de pourpre de Ruhemann (tableau VI).

TABLEAU VI

Concentration en P en $atgl^{-1}$	Densité optique après 1h
0	0,115
2×10^{-3}	0,060
$4,1 \times 10^{-3}$	0,053
$8,3 \times 10^{-3}$	0,070
16×10^{-3}	0,075
33×10^{-3}	0,060

Afin de préciser cependant l'influence des phosphates sur la réactivité des amines avec la ninhydrine, nous avons fait appel à une amine particulierement réactive, la benzylamine. Dans les mêmes conditions de concentration que celles utilisées pour l'alanine, l'addition de phosphatesfavorise considérablement la réaction (tableau VII).

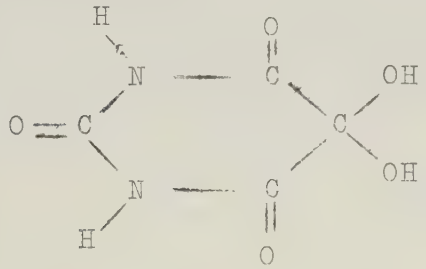
TABLEAU VII

Concentration en P en μgtl^{-1}	Densité optique après 1h
0	0,075
2×10^{-3}	0,165
$4,1 \times 10^{-3}$	0,295
$8,3 \times 10^{-3}$	0,400
16×10^{-3}	1,405
33×10^{-3}	1,270

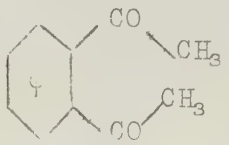
VII - SPECIFICITE D'ACTION DE LA NINHYDRINE

La ninhydrine n'est pas le seul composé polycarbonylé à fournir des réactions colorées avec les produits possédant un groupement $-NH_2$.

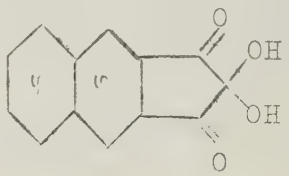
Pour savoir si la réaction photochimique qui fait l'objet de notre travail était strictement spécifique de l'hydrate du tricétoindane, nous avons effectué quelques essais avec l'alloxanne (XXXVI), l'orthodiacétylbenzene (XXXVII) et une ninhydrine substituée (XXXVIII), l'hydrate de benzo-5,6-indanetrione-1,2,3.



(XXXVI)



(XXXVII)



(XXXVIII)

L'alloxanne réagit avec les composés aminés en donnant une coloration rose, qui traduit la formation de murexide [69]. En remplaçant la ninhydrine par de l'alloxanne dans le protocole opératoire de

la page 21, nous avons constaté que le phényl-1-amino-2-propane ne conduit pas à la formation de murexide, même après 24 heures de séjour à l'obscurité ; l'irradiation de ce mélange n'entraîne pas de coloration rose. La même expérience, réalisée avec des concentrations doubles de phényl-1-amino-2-propane et d'alloxanne, s'avère également négative, ainsi d'ailleurs qu'une expérience effectuée avec l'alloxanne et la phényl-1-propylamine, dont nous verrons plus loin la grande réactivité vis à vis de la ninhydrine. Ces essais négatifs semblent pouvoir s'expliquer par la labilité de l'alloxanne en présence d'eau.

Nous avons effectué également quelques essais avec l'orthodiacétyl-benzène (XXXVII), substance qui donne avec les composés aminés une réaction colorée assez intense [6, 19, 60]. Le phényl-1-amino-2-propane ne donne lieu à aucune coloration, à l'obscurité comme après irradiation.

La benzo-5,6-indanetrione-1,2,3 (XXXVIII) a été décrite en 1957 par Meler et Lotter [25](*). Etudié en remplacement de la ninhydrine dans le protocole de la page 21, le composé XXXVIII ne donne aucune coloration avec le sulfate de phényl-1-amino-2-propane apres 24h de séjour à l'obscurité ; l'irradiation du mélange réactionnel, dans les conditions habituelles, s'accompagne du développement rapide d'une coloration verte (figure 20).

Nous constatons que l'adjonction d'un noyau aromatique supplémentaire sur la molécule de ninhydrine a considérablement augmenté la réactivité de la tricétone.

(*) Ce produit a été synthétisé dans notre laboratoire par Mme M. Bourhis qui en effectue une étude très complete et qui a bien voulu nous donner un échantillon de ce produit.

C H A P I T R E III

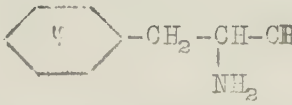
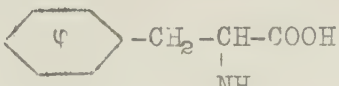
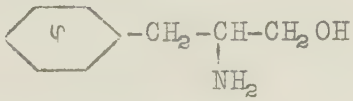
-:-:-:-:-:-:-:-

Réaction photochimique des amines (R,R')CH-NH_2 avec la ninhydrine.

Le phényl-1-amino-2-propane doit son absence de réactivité à l'obscurité avec la ninhydrine, dans les conditions particulièrement douces que nous avons sélectionnées, au fait que le carbone porteur de la fonction amine primaire n'est lié qu'à un seul atome d'hydrogène et qu'il ne supporte par ailleurs aucune fonction susceptible de libérer un proton. Ceci est bien démontré par l'étude du comportement de la ninhydrine vis-à-vis de composés voisins (tableau VIII).

TABLEAU VIII

Réaction de la ninhydrine avec le phényl-1-amino-2-propane et avec différents composés apparentés.
Conditions opératoires : voir p. 21.

Composé	Lecture après	Densité optique à λ = 570 nm
 DL-phényl-1-amino-2-propane	24 heures	0,000
 L-phénylalanine	3 heures	2,250
 DL-phénylalaninol	3 heures	0,158

Comme nous le savons maintenant, la formation de pourpre de Ruhemann avec le phényl-1-amino-2-propane est déclenchée par l'irradiation du mélange préalablement incubé à l'obscurité. Ce comportement est commun à de nombreuses amines du type $(R,R')CH-NH_2$ que nous examinerons dans ce chapître. Nous étudierons successivement quelques représentants :

- des amines aliphatiques,
- des amines cyclaniques,
- des amines aromatiques.

Nous terminerons ce chapître en examinant les divers exemples d'amines $(R,R')CH-NH_2$ qui nous ont permis de noter la formation "directe" de pourpre de Ruhemann, sans activation photochimique.

I - AMINES ALIPHATIQUES

Nous avons étudié, comparativement au sulfate de phényl-1-amino-2-propane, 23 amines aliphatiques. Les résultats que nous avons obtenus en utilisant le protocole habituel (voir p. 21) sont groupés dans le tableau IX ; notons qu'aucune des substances examinées n'a fourni de pourpre de Ruhemann pendant la période d'incubation à l'obscurité.

TABLEAU IX

Réaction photochimique des amines aliphatiques avec la ninhydrine.

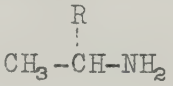
Composé	Pourpre de Ruhemann formé en p. 100, par rapport à l'étalon interne
isopropylamine, HCl	9
DL-amino-2-butane, HCl	29
DL-amino-3-diméthyl-2,2-butane, HCl	177
DL-amino-2-méthyl-3-butane, HCl	78
DL-amino-2-méthyl-4-pentane, ½ H_2SO_4	67
DL-amino-2-méthyl-3-pentane, HCl	92
DL-amino-2-pentane, HCl	42
amino-3-pentane, HCl	92
DL-amino-2-méthyl-5-hexane, HCl	61
DL-amino-2-hexane, HCl	52
DL-amino-3-hexane, HCl	128
DL-amino-2-méthyl-4-hexane, HCl	84
DL-amino-2-heptane, ½ H_2SO_4	64
DL-amino-3-heptane, HCl	155
amino-4-heptane, HCl	162
DL-amino-2-méthyl-6-heptane, ½ H_2SO_4	55
DL-amino-2-octane, HCl	62
DL-amino-3-octane, HCl	153
DL-amino-4-octane, HCl	179
DL-amino-2-nonane, HCl	64
DL-amino-3-nonane, HCl	162
DL-amino-2-decane, HCl	62
DL-amino-2-dodécane, HCl	60

Nous pouvons dégager de ces résultats quelques conclusions relatives à l'influence de la structure du composé aminé sur sa réactivité vis-à-vis de la ninhydrine.

1°) - Influence de la longueur de la chaîne carbonée

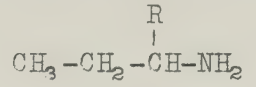
Nous avons pu examiner deux séries :

- des éthylamines-1-substituées de formule :



dans lesquelles le radical R augmente du groupement méthyle au groupement n-décyle ;

- des propylamines-1-substituées de formule :



dans lesquelles le radical R augmente du groupement méthyle au groupement hexyle.

Dans les deux séries, on observe une augmentation de la réactivité en fonction de l'allongement du radical R, mais cette augmentation reste limitée aux premiers termes, ce qui se traduit sur le diagramme de la figure 21 par l'apparition d'un plateau.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux obtenus dans la série des amines non ramifiées, spontanément réactives avec la ninhydrine [38, 39]. Si l'on excepte la méthylamine, particulièrement réactive, on observe pour les amines dont la longueur de chaîne passe de C_2 à C_{12} une augmentation de la réactivité quand le nombre d'atomes de carbone augmente. Sans conduire à un véritable plateau, on remarque toutefois que l'adjonction d'un carbone supplémentaire entraîne une augmentation de réactivité de moins en moins accusée quand les chaînes deviennent plus longues.

Les amines qui font l'objet de notre étude étant toutes de formule générale $(R,R')CH-NH_2$, l'influence de la longueur de la chaîne peut être aussi examinée en allongeant progressivement les radicaux R et R', à partir de l'isopropylamine (molécule symétrique par rapport au groupement dérivé) ainsi qu'à partir de l'amino-2-butane (molécule disymétrique par rapport au groupement aminé). C'est ce que nous avons schématisé dans la figure 22, où l'influence favorable de l'allongement de la chaîne apparaît d'une manière particulièrement nette.

2°) - Influence de l'emplacement du groupement $-NH_2$ sur la chaîne carbonée

Nous avons déjà signalé qu'une amine dont le groupement $-NH_2$ est lié à un atome de carbone primaire réagit "spontanément" avec la ninhydrine, en l'absence de toute influence photochimique. Lorsque le groupement aminé est lié à un atome de carbone secondaire, l'irradiation lumineuse après incubation à l'obscurité devient nécessaire : la réactivité vis-à-vis de la tricétone est en rapport avec l'emplacement du groupement $-NH_2$ sur la chaîne. Les résultats groupés ci-dessous (tableau X) montrent qu'une position plus centrale du groupement azoté s'accompagne d'une formation plus importante de pourpre de Ruhemann.

TABLEAU X

Réaction photochimique d'amines aliphatiques avec la ninhydrine. Influence de l'emplacement du groupement $-NH_2$ sur la chaîne carbonée.
Les chiffres sont donnés en pourcentage par rapport au témoin interne.

amino-2-pentane	42	amino-3-pentane	92		
amino-2-hexane	52	amino-3-hexane	128		
amino-2-heptane	64	amino-3-heptane	155	amino-4-heptane	162
amino-2-octane	62	amino-3-octane	153	amino-4-octane	179
amino-2-nonane	64	amino-3-nonane	162		

Placer un groupement aminé en 2 ou en 3 sur la chaîne carbonée revient, dans une amine de structure $(R,R')CH-NH_2$, à remplacer le groupement $R = CH_3$ par un groupement $R = -CH_2-CH_3$; ceci nous conduit donc à examiner l'influence de la structure du groupement substituant au voisinage de la fonction aminée.

3°) - Influence de la structure du groupement substituant

Le remplacement, dans la molécule d'isopropylamine, du groupement méthyle par les groupements éthyle, isopropyle ou tert-butyle, c'est-à-dire une accumulation de groupements $-CH_3$ au voisinage de la fonction amine, s'accompagne d'une augmentation régulière de la réactivité (figure 23).

L'influence favorable du groupement méthyle est d'autant plus manifeste que ce groupement est plus proche de la fonction aminée, comme le montre la comparaison entre les produits suivants :

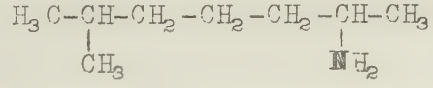
- méthyl-3-amino-2-pentane ..... 92 %
- méthyl-4-amino-2-pentane ..... 67 %
- méthyl-5-amino-2-pentane (amino-2-hexane) ..... 51 %

ou encore :

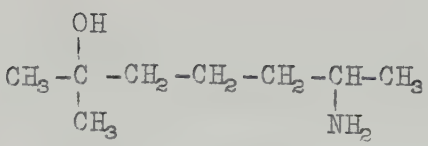
- méthyl-4-amino-2-hexane ..... 84 %
- méthyl-5-amino-2-hexane ..... 61 %

Les mêmes conclusions peuvent être formulées pour le groupement isopropyle en comparant le méthyl-3-amino-2-butane, le méthyl-4-amino-2-pentane, le méthyl-5-amino-2-hexane et le méthyl-6-amino-2-heptane (figure 23).

La présence d'un groupement hydroxyle au voisinage du groupement isopropyle entraîne une baisse sensible de la réactivité :

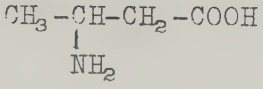


- méthyl-6-amino-2-heptane, sulfate ..... 55 %



- amino-6-méthyl-2-heptanol-2, HCl ..... 29 %

Nous avons effectué une expérience avec l'acide β-aminobutyrique, composé qui résulte de la substitution du groupement méthyle



terminal de l'amino-2-butane par un groupement carboxylique : ce produit ne donne de pourpre de Ruhemann ni après incubation de 24 h à l'obscurité, ni après irradiation lumineuse.

II - AMINES CYCLANIQUES

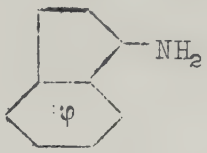
Nous avons pu, dans cette série, étudier les six produits groupés dans le tableau XI : ils constituent une variété particulière d'amines de type $(R,R')CH-NH_2$ dont les radicaux R et R' font partie intégrante d'une structure cyclanique. Ici encore, aucune de ces substances n'a fourni de pourpre de Ruhemann à la suite de la seule incubation à l'obscurité.

TABLEAU XI

Réaction photochimique des amines cyclaniques avec la ninhydrine.

Composé	Pourpre de Ruhemann formé, en %, par rapport à l'étalon interne
Cyclopropylamine, ½ H_2SO_4	3
Cyclopentylamine, HCl	66
Cyclohexylamine, HCl	30
Cycloheptylamine, HCl	35
Cyclo-octylamine, ½ H_2SO_4	41
Amino-2-indane, HCl	12

Notons la réactivité plus élevée de la cyclopentylamine ; cette substance présente une réactivité plus importante que l'amino-2-pentane, structure ouverte correspondante. La réactivité de la cyclopentylamine est cependant inférieure à celle de l'amino-3-pentane. L'adjonction à la cyclopentylamine d'un noyau benzénique conduit à l'amino-1-indane ou à l'amino-2-indane.



amino-1-indane

amino-2-indane

L'amino-2-indane, qui ne réagit pas avec la ninhydrine à l'obscurité, donne lieu à une réaction photochimique nettement plus faible que celle de la cyclopentylamine. Le comportement de l'amino-1-indane sera examiné plus loin (voir p. 64).

Pour les autres amines cyclaniques, la présence du cycle correspond toujours à une diminution de réactivité par rapport aux différentes structures linéaires possédant le même nombre d'atomes de carbone (figure 24).

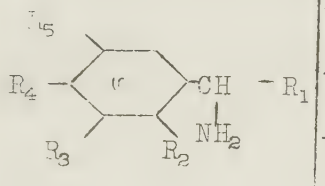
III - AMINES AROMATIQUES

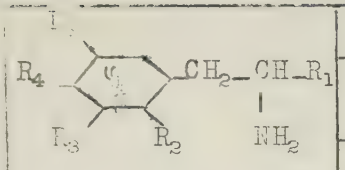
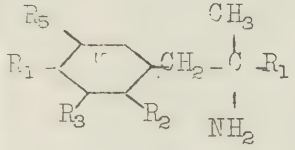
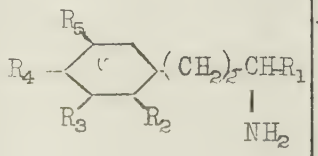
Le phényl-1-amino-2-propane, composé qui est au centre de notre étude et qui nous sert constamment de témoin interne, entre précisément dans le groupe des amines aromatiques.

Nous avons étudié parallèlement les composés indiqués dans le tableau XII.

TABLEAU XII

Réaction photochimique des amines aromatiques avec la ninhydrine.

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Composé	Pourpre de Ruhemann formé en % par rapport à l'étalon interne
	$-CH_3$	-H	-H	-H	-H	DL-α-méthylbenzylamine, HCl	153
	$-CH_2-CH_3$	-H	-H	-H	-H	DL-α-phénylpropylamine, HCl	248
	$-CH_2-COOH$	-H	-H	-H	-H	DL-β-phényl-β-alanine	22
	$-(CH_2)_2-CH_3$	-H	-H	-H	-H	DL-α-phénylbutylamine, HCl	246
	$-CH_2-C_6H_5$	-H	-H	-H	-H	DL-amino-1-diphényl-1,2-éthane, HCl	310
	$-CH_3$	-H	-H	C_3H_7O-	-H	DL-(n-propoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	185
	$-CH_3$	-H	-H	$-O-C_6H_5$	-H	DL-(phénoxy-4'-phényl)-1-éthylamine HCl	195
	$-CH_3$	-H	-H	$-O-C_6H_4-CH(NH_2)-CH_3$	-H	éther di-(amino-1'-éthyl)-4-phénylique racémique, 2HCl	330
	$-CH_3$	-H	$-O-CH(CH_3)_2$	$-OH_7C_3$	-H	DL-(méthoxy-4'-isopropoxy-3'-phényl) 1-éthylamine, HCl	215
	$-CH_3$	-H	$-O-CH_3$	$-O-C_6H_{11}$	-H	DL-(méthoxy-4'-cyclohexoxy-3'-phényl)-1-éthylamine, HCl	225

	-CH_3	-H	-H	-H	-H	DL-phényl-1-amino-2-propane, ½ H_2SO_4	100
	-CH_3	-H	-H	-OH	-H	DL-(hydroxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane HBr.	125
	-CH_3	-H	-H	-OCH_3	-H	DL-(méthoxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane ½ H_2SO_4	130
	-CH_3	-H	-OCH_3	-O-CH_2-O-		DL-méthoxy-3-méthylenedioxy-4,5-amphétamine, HCl	131
	-CH_3	-OCH_3	-H	-H	-OCH_3	DL-(diméthoxy-2',5'-phényl)-1-amino 2-propane, HCl	95
	-H_2C-	-H	-H	-H	-H	α-benzylphényléthylamine, HCl	337
	-CH_3	-H	-H	-H	-H	(p-chlorophényl-1-méthyl-2-amino-2-propane, HCl	0
	-CH_3	-H	-H	-H	-H	amino-3-phényl-1-butane, HCl	81

1°) - Influence du noyau benzénique

Notons d'abord, en comparant le phényl-1-amino-2-propane et l'isopropylamine, l'influence particulièrement favorable du noyau benzénique. Cette influence est d'autant plus manifeste que la structure cyclique est plus voisine du groupement aminé (figure 25): l'α-méthylbenzylamine donne lieu à une formation de pourpre de Ruhemann 50 % plus élevée que celle de notre témoin, tandis que la réactivité de l'amino-3-phényl-1-butane est inférieure à celle de l'amphétamine.

Les différences de comportement que nous venons d'indiquer sont décelables sur des mesures de densité effectuées dans nos conditions habituelles d'irradiation, précisées plus haut (voir p. 21). Une étude plus précise de l'apparition du pourpre de Ruhemann au cours de l'irradiation nous a montré que l'influence de la position du noyau benzénique se manifeste d'une manière encore plus apparente au début de l'irradiation. Les courbes de la figure 26 A illustrent bien ce phénomène tout comme la variation du rapport :

$$R = \frac{\text{densité optique de l'amine examinée}}{\text{densité optique du phényl-1-amino-2-propane}}$$

aux divers temps de l'irradiation (figure 26B).

Les valeurs données dans le tableau XII, établies après une irradiation de 50 minutes (lampe de 300 W), permettent cependant une comparaison suffisante entre les différentes amines aromatiques établies.

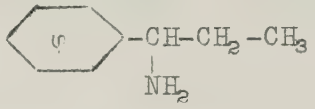
2°) - Modifications dans la chaîne latérale

Remarquons tout d'abord la présence obligatoire, pour obtenir la formation de pourpre de Ruhemann, d'un atome d'hydrogène sur l'atome de carbone porteur de la fonction aminée : le (p-chlorophényl)-1-méthyl-2-amino-2-propane est dépourvu de toute réactivité.

Dans la série de l'α-méthylbenzylamine, l'adjonction d'un groupement méthyle (α-phénylpropylamine) ou éthyle (α-phénylbutylamine)

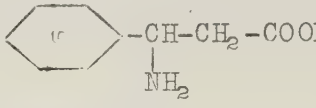
sur la chaîne latérale augmente la réactivité. L'addition d'un noyau benzénique supplémentaire, dans la série de l'α-méthylbenzylamine comme dans celle de l'amphétamine, favorise également -et d'une manière considérable- la formation du pourpre de Ruhemann, comme le montre la comparaison entre α-méthylbenzylamine et diphényl-1,2-éthylamine d'une part, entre amphétamine et α-benzylphényléthylamine d'autre part.

Le remplacement d'un groupement méthyle par un groupement carboxylique s'accompagne d'effets très différents selon la position de la fonction acide par rapport au groupement aminé. Si le -COOH est en α de la fonction amine, la molécule réagit avec la ninhydrine directement (C-phénylglycocolle, phénylalanine, acide γ-phényl-α-aminobutyrique). Lorsque ce même groupement se trouve situé en position β, non seulement on n'observe pas de formation directe de pourpre de Ruhemann, mais de plus, la réaction photochimique se trouve très diminuée : ceci est manifeste lorsqu'on compare l'α-phénylpropylamine à la β-phényl-β-alanine.



..... 248

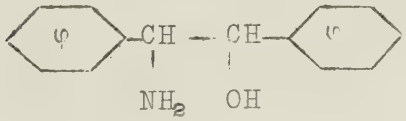
α-phénylpropylamine

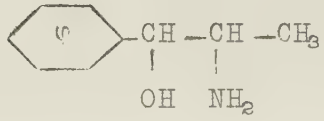


..... 22

β-phényl-β-alanine

Signalons que la présence d'un groupement hydroxylé en α de la fonction amine permet également une réaction directe avec la ninhydrine, puisque la diphényl-1,2-éthanolamine ainsi que la nor-éphédrine, dans leurs deux variétés érythro- et thréo-, conduisent facilement au pourpre de Ruhemann [54].

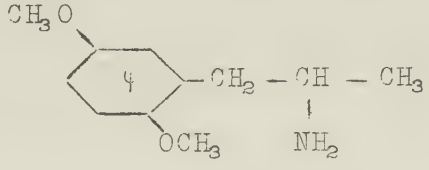




3°) - Substitution du noyau aromatique

La présence sur le noyau benzénique d'un substituant en position para constitue, dans tous les exemples que nous avons pu étudier, un facteur favorable à la formation de pourpre de Ruhemann, que ce substituant soit constitué par un groupement hydroxylé (parédrine ou (hydroxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane), méthoxylé ((méthoxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane), propoxylé ((n-propoxy-4'-phényl)-1-éthylamine) ou phénoxylé ((phénoxy-4'-phényl)-1-éthylamine). A ce dernier exemple se rattache l'éther di-(amino-1'-éthyl)-4-phénylique, qui s'est montré très fortement réactif. Il est vrai que ce composé possède dans sa molécule deux groupements aminés. Aussi avons nous effectué une expérience dans laquelle cet éther était étudié à une concentration moléculaire deux fois plus petite (0,7812 µmole/ml) que celle du protocole habituel : la valeur de la densité optique ainsi obtenue (183 %) demeure nettement supérieure à celle observée avec l'amphétamine, bien que la comparaison soit effectuée dans des milieux renfermant initialement le même nombre de groupements aminés.

Le tableau XII groupe encore d'autres produits de substitution plus complexes de l'α-méthylbenzylamine et de l'amphétamine : ils se montrent tous aussi plus réactifs que la forme substituée à l'exception de la diméthoxy-2,5-amphétamine. La formule ci-dessous montre la possibilité d'un encombrement stérique au voisinage de la fonction aminée.



IV - AMINES (R,R')CH-NH_2 "SPONTANEMENT" REACTIVES

Nous avons déjà signalé plus haut (voir p. 58) que les composés aminés de structure (R,R')CH-NH_2 peuvent réagir "spontanément" avec la ninhydrine, en l'absence de toute excitation photochimique, si l'un

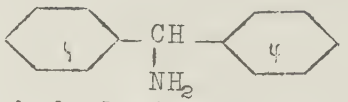
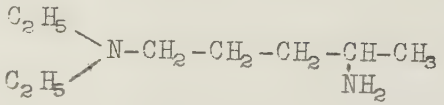
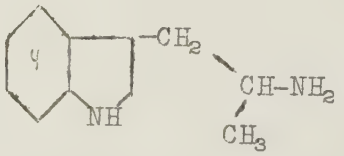
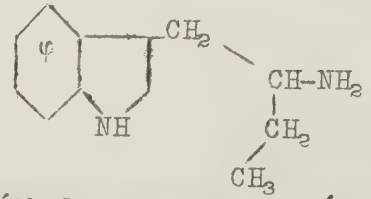
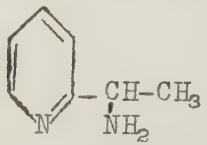
des radicaux R ou R' est constitué par un groupe carboxylique (α-amino-acides) ou par un groupement hydroxyméthylé (alcools primaires α-aminés). Au cours de notre travail (ainsi qu'au cours d'investigations effectuées parallèlement dans notre laboratoire), nous avons remarqué que ces conditions n'étaient pas limitatives et que plusieurs produits de formule $(R,R')CH-NH_2$ conduisent à la formation de pourpre de Ruhemann après 24 heures de contact à l'obscurité en présence de ninhydrine.

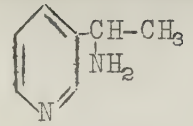
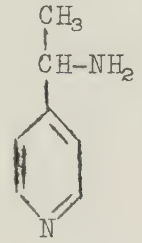
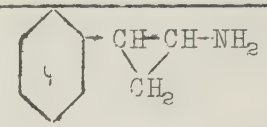
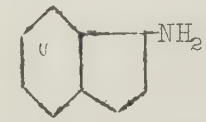
Ces substances comprennent celles qui ont été groupées dans le tableau XIII et les amines α-carbonylées.

TABLEAU XIII

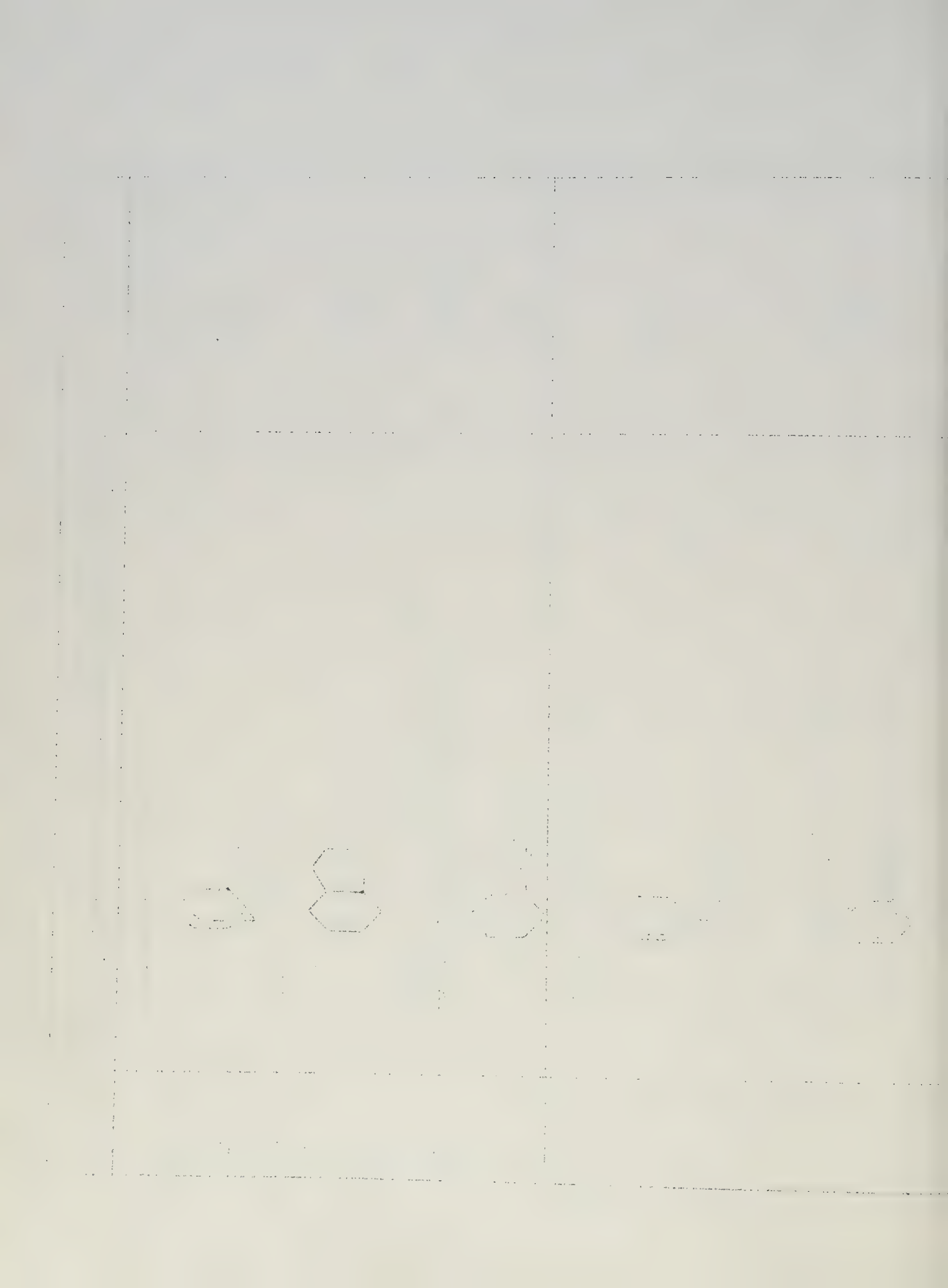
Amines (R,R')CH-NH_2 spontanément réactives.

Conditions opératoires : voir p. 21.

	Composé	Densité optique après 24h. d'incubation à l'obscurité à λ=570 nm
R et R' séparés	 Benzhydrylamine, HCl	0,115
	 (diéthylamino)-5-amino-2-pentane, 2HCl	0,770
	 α-méthyltryptamine, HCl	0,065
	 α-éthyltryptamine, acétate	0,075
	 α-(pyridyl-2)-éthylamine, 2HCl	coloration orangée

	 α-(pyridyl-3)-éthylamine, 2HCl	0,020
	 α-(pyridyl-4)-éthylamine, 2HCl	0,164
R et R' engagés dans un cycle	 cis-phényl-2-cyclopropylamine, HCl trans-phényl-2-cyclopropylamine, HCl	1,450 (*) 0,400 (*)
	 amino-1-indane, HCl	0,400
	 amino-3-quinuclidine, 2HCl	0,300

(*) Densité optique mesurée à la 120ème minute d'expérience



La benzhydrylamine peut être utilement comparée à l'isopropyl amine et à l'α-méthylbenzylamine. L'isopropylamine (tableau IX) ne réagit pas avec la ninhydrine à l'obscurité et ne donne lieu qu'à une réaction photochimique très minime. Le remplacement d'un des deux groupements méthyle par le noyau du benzène conduit à l'α-méthylbenzylamine, dont la réaction photochimique est intense. L'introduction d'un deuxième noyau benzénique augmente encore la réactivité de l'amine au point que s'observe, après 24 h de contact à l'obscurité, une densité optique à λ = 570 nm de 0,115. L'irradiation du milieu réactionnel, dans nos conditions habituelles, élève la densité optique à la valeur de 0,800.

Le (diéthylamino)-5-amino-2-pentane s'est montré également très réactif (d.o. = 0,770 après 24 h à l'obscurité) ; l'introduction du groupement diéthylamine à l'extrémité de la molécule de l'amino-2-pentane constitue donc un facteur particulièrement favorable, que nous retrouvons d'ailleurs dans des exemples de molécules plus simples comme celles indiquées ci-dessous:

	Densité optique après 180 minutes.
$CH_3-CH_2-CH_2-NH_2$	0,030
n-propylamine	
$(C_2H_5)_2N-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$	0,890
(diéthylamino)-3-n-propylamine	

L'irradiation ultérieure du mélange réactionnel contenant le (diéthylamino)-5-amino-2-pentane fait passer la densité optique de 0,770 à 0,885 : l'effet photochimique est donc encore notable, mais on ne peut en tirer de conclusions quantitatives en raison de la coloration importante du milieu réactionnel existant déjà au début de l'irradiation.

Le comportement de l'α-méthyl- et de l'α-éthyltryptamine mérite une attention particulière : ces deux composés semblent plus réactifs

que notre témoin habituel, le phényl-1-amino-2-propane, puisqu'ils conduisent à la formation d'une petite quantité de pourpre de Ruhemann au cours de l'incubation à l'obscurité. Toutefois, l'effet photochimique est peu marqué, puisqu'après l'irradiation on observe des densités optiques assez faibles ne correspondant respectivement qu'à 39 et à 57 %.

Les trois α-pyridyléthylamines isomères constituent des analogues de l'α-méthylbenzylamine, dont elles ne diffèrent que par la présence d'un hétéro-atome d'azote dans la partie cyclique de la molécule. Le mélange réactionnel contenant l'α-(pyridyl-2)éthylamine se colore en rouge orangé à l'obscurité et l'irradiation ultérieure ne modifie que peu la coloration du milieu. L'α-(pyridyl-3)éthylamine ne donne à l'obscurité que des traces de pourpre de Ruhemann, ce dernier se formant au cours de l'irradiation en proportion plus forte qu'avec l'amphétamine (110 %). La réactivité apparaît donc inférieure à celle de l'α-méthylbenzylamine. L'α-(pyridyl-4)éthylamine est plus réactive : l'irradiation augmente ici encore très sensiblement la quantité de pourpre de Ruhemann formé.

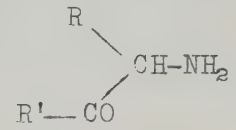
La coloration "directe" importante obtenue avec les isomères cis- et trans- de la phénylcyclopropylamine s'explique par l'instabilité du cycle cyclopropanique : nous avons, en effet, mis en évidence [48, 49] l'ouverture de ce cycle, qui se traduit par la formation d'aldéhyde cinnamique au cours de la dégradation de Strecker.

L'amino-1-indane peut être comparé à l'α-phénylpropylamine, dont il constitue un produit de cyclisation. Après 24 h de séjour à l'obscurité, la densité optique est importante, mais elle ne s'accroît que faiblement par irradiation lumineuse.

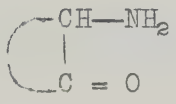
L'amino-3-quinuclidine entre également dans la série d'amines $(R,R')CH-NH_2$ à réactivité directe : nous ne pouvons commenter ce résultat car nous n'avons pu nous procurer d'amines plus simples de structure comparable.

Amines α-carbonylées

Parmi les amines de structure $(R,R')CH-NH_2$, les amines α-carbonylées à chaîne aliphatique



ou cycliques



occupent une place particulière car ces substances, pour la plupart, se montrent directement réactives avec la ninhydrine, et la formation du pourpre de Ruhemann est souvent très importante.

a)- amines α-carbonylées à chaîne aliphatique

Dans ce groupe se rangent les peptides, dont Neuzil et Breton [7, 35] ont étudié la réaction avec la ninhydrine, particulièrement dans le groupe des dipeptides. Nous rappellerons quelques conclusions de ces travaux :

- les dipeptides réagissent avec la ninhydrine en l'absence de toute excitation photochimique ;
- la réactivité est toujours plus faible que celle de l'acide aminé N-terminal étudié isolément ;
- en milieu eau-tert-butanol tamponné (milieu que nous utilisons également dans notre travail), la cinétique de formation du pourpre de Ruhemann est différente de celle des α-amino acides (figure 27);
- la réactivité d'un dipeptide est conditionnée à la fois par la nature de l'acide amino-N-terminal et de l'acide amino-C-terminal.

Nous avons poursuivi ces travaux initiaux [50, 52] et avons remarqué que, dans le groupe des dipeptides à valine N-terminale, seuls

quelques composés donnent une réaction directe avec la ninhydrine ; les autres, même après 24 h de contact à l'obscurité, ne fournissent pas la moindre trace de pourpre de Ruhemann (tableau XIV).

TABLEAU XIV

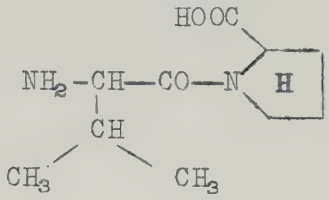
Réaction des peptides à Valine N-terminale avec la ninhydrine.
Conditions opératoires de la p. 21

Composé	Densité optique après 24 h à l'obscurité	Pourpre de Ruhemann formé par irradiation, en % par rapport à l'étalon interne
-Valyl-L-Glycine	0,000	71
-Valyl-Glycinamide, HCl	0,000	5
-Valyl-Glycinamide, base	0,000	3
-Valyl-Glycine-Glycine	0,000	19
-Valyl-Alanine	0,361	
-Valyl-β-Alanine	0,000	73
-Valyl-L-Valine	0,000	241
-Valyl-L-Norvaline	0,000	197
-Valyl-L-Leucine	0,000	203
-Valyl-L-Leucinamide, HCl	0,000	78
-Valyl-L-Leucinamide, base	0,000	60
-Valyl-L-Isoleucine	0,000	298
-Valyl-L-Sérine	0,000	97
-Valyl-L-Méthionine	0,000	245
ɔide L-Valyl-L-Aspartique	0,000	25
ɔide L-Valyl-L-Aspartique, base	0,000	31
-Valyl-L-Lysine, acétate	0,210	
-Valyl-L-Lysine, base	0,330	
-Valyl-L-Phénylalanine	0,000	209
-Valyl-L-Tyrosine	0,000	251
-Valyl-L-Tryptophane	0,000	194
-Valyl-L-Proline	1,440	

Parmi les peptides directement réactifs, deux présentent des particularités structurales :

- la L-Valyl-L-Lysine, dont la fonction amine ε-terminale suffit à expliquer le comportement avec la ninhydrine;

- la L-Valyl-L-Proline, dans laquelle l'atome d'azote du groupement peptide n'est relié à aucun atome d'hydrogène :



La L-Valyl-L-Alanine, assez nettement réactive, ne possède aucun élément structural particulier lorsqu'on la compare à la L-Valyl-Glycine ou à la L-Valyl-L-Norvaline, non directement réactives. La formation du pourpre de Ruhemann ne semble pas provenir d'une impureté, car la chromatographie (phase solvante : n-butanol, acide acétique, eau, 12 :3:5 vol/vol) de la L-Valyl-L-Alanine ne montre qu'une tache unique (R_f = 0,62) différente de celle de la valine (R_f = 0,55) et de celle de l'alanine (R_f = 0,32).

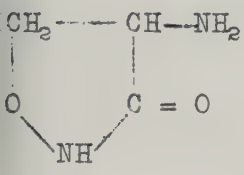
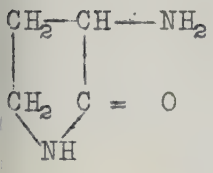
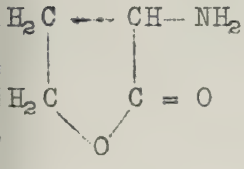
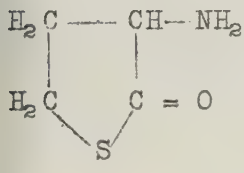
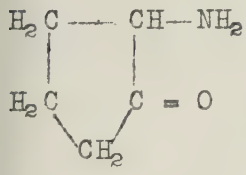
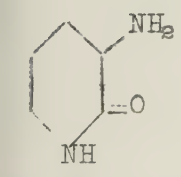
b) - aminos α-carbonylées cycliques

On sait depuis 1957 [32, 33, 34] que la cyclosérine, en présence de ninhydrine, conduit très rapidement à la formation de pourpre de Ruhemann. Cette substance entre cependant dans le même groupe d'amines (R,R')CH-NH_2 que la cyclopentylamine, groupe dans lequel les radicaux R et R' sont engagés dans la formation d'un cycle.

Plusieurs composés cycliques, possédant comme la cyclosérine une fonction carbonylée située en α- de la fonction amine et sur le cycle, manifestent également une réactivité directe importante (tableau XV).

TABLEAU XV

Réaction des amines α-carbonylées cycliques avec la ninhydrine.

Composé		Densité optique à λ=570 nm Lecture après (minutes)	
	cyclosérine	0,847	(15')
	aminopyrrolidone, HCl	0,200	(180')
	aminopyrrolidone, base	0,110	(180')
	homosérine lactone, HCl	0,260	(15')
	homosérine lactone, base	0,390	(15')
	homosérine thiolactone, HCl	0,750	(2')
	homosérine thiolactone, base	0,960	(2')
	α-aminocyclopentanone, HCl	0,734	(180')
	α-aminocyclopentanone, base	0,785	(180')
	aminopipéridone, HCl	0,368	(180')
	aminopipéridone, base	0,321	(180')

C H A P I T R E IV

-:-:-:-:-:-:-:-:-

Identification photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ en chromatographie de partage.

N'ayant pas, en effet, trouvé dans la littérature de réaction permettant de faire la distinction entre les amines $R-CH_2-NH_2$ et les amines $(R,R')CH-NH_2$, il nous a paru intéressant d'essayer d'appliquer la réaction photochimique si particulière que fournissent les amines du second type avec la ninhydrine à l'identification de ces composés en chromatographie de partage. La réaction photochimique peut en effet se réaliser également sur le papier et sur d'autres supports ; nous décrivons successivement le mode opératoire que nous avons mis au point ainsi que les résultats obtenus.

I - LA REACTION PHOTOCHIMIQUE EN CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons déposé sur une feuille de papier à chromatographie (Schleicher et Schull n° 2043 b) 50 µg des composés suivants, dissous dans 10 µl d'eau :

1 phényl-2-éthylamine, HCl
2 phényl-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2} H_2SO_4$
3 benzylamine, HCl
4 phényl-1-éthylamine, HCl
5 phényl-1-propylamine, HCl

(les composés 1 et 3 sont des amines de structure $R-CH_2-NH_2$, les trois autres sont de la forme $(R,R')CH-NH_2$).

On effectue ensuite une chromatographie unidimensionnelle ascendante, avec comme phase solvante du n-butanol acétique (n-butanol, acide acétique, eau, 2 : 1:1 vol/vol et on prélève après déphasage la

phase organique).

Après développement, le chromatogramme est séché dans un courant d'air. On le porte ensuite dans une chambre noire où on l'imprègne, par immersion rapide, d'une solution de ninhydrine à 0,25 % dans l'acétone. On le sèche à l'air libre pendant 60 minutes à la température ambiante et toujours à l'obscurité (on peut utiliser, pour ces diverses manipulations, le faible éclairage d'une lanterne pour travaux photographiques). Puis on le sort de la pièce obscure entre deux feuilles de papier noir qui le protègent de la lumière. On l'expose alors à une vive lumière artificielle (ou au soleil). Dès que l'on dévoile le chromatogramme, les spots des amines $R-CH_2-NH_2$, qui ont réagi avec la ninhydrine pendant le séjour à l'obscurité, se montrent bien colorés (figure 28). Au contraire, les spots des amines $(R,R')CH-NH_2$ non immédiatement visibles, apparaissent progressivement au cours de l'exposition à la lumière. Nous avons vérifié que le léger échauffement du papier ainsi réalisé n'est pas le facteur responsable de l'apparition du pourpre de Ruhemann et qu'il s'agit bien d'un effet purement photochimique.

II - RECHERCHE D'UN PROTOCOLE GENERAL

L'expérience illustrée par la figure 28 montre que la réaction photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ peut se réaliser sur les chromatogrammes et est ainsi susceptible d'aider à différencier ces composés des amines du type $R-CH_2-NH_2$ qui réagissent avec la ninhydrine à l'obscurité.

Afin d'utiliser cette propriété dans le domaine de la chimie analytique, il est nécessaire de préciser les conditions dans lesquelles on peut déceler, par la réaction photochimique, la plus faible quantité possible d'une amine de type $(R,R')CH-NH_2$, tout en maintenant à la réaction sa spécificité. Toutes ces manipulations étant effectuées à la température du laboratoire (en particulier le séchage du chromatogramme après son imprégnation par la solution de ninhydrine qui demeure donc un paramètre constant), nous pouvons modifier :

- la concentration de la solution de ninhydrine utilisée pour imprégner le support du chromatogramme,
- le temps d'incubation à l'obscurité,
- l'intensité de l'éclairage,
- la durée d'irradiation.

Nous avons tout d'abord augmenté la concentration de la solution acétonique de ninhydrine à la valeur de 0,5 % de façon à être certain que la tricétone se trouve largement en excés au niveau des taches susceptibles de se révéler par cette réaction. Dans ces conditions, nous avons vérifié que nos amines $(R,R')CH-NH_2$ les plus réactives, la phényl-1-propylamine et la phényl-1-butylamine notamment, dont on dispose sur les chromatogrammes une quantité de 50 µg, ne donnent lieu à aucune formation de pourpre de Ruhemann après 4 heures de séjour à l'obscurité. Par souci d'une sécurité supplémentaire, et également pour ne pas trop prolonger la durée de la technique analytique que nous proposons, le séjour à l'obscurité a été fixé à 120 minutes.

La source lumineuse est constituée par une lampe de 300 W que nous maintenons à 40 cm du chromatogramme, son rayonnement étant filtré par une cuve à faces parallèles de 15 cm d'épaisseur remplie d'eau afin de limiter l'élévation de la température. On peut aussi exposer la feuille à la lumière directe du soleil. Pour observer d'une manière commode la réaction photochimique, nous avons estimé que l'irradiation ne devait pas dépasser 15 minutes.

Lorsque toutes ces conditions sont réunies, la limite de détection de substances aminées $(R,R')CH-NH_2$ par la réaction photochimique est voisine de 5 µg.

III - LA REACTION PHOTOCHIMIQUE SUR D'AUTRES SUPPORTS CHROMATOGRAPHIQUES

La détection photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ est également réalisable avec d'autres supports chromatographiques que le papier. Nous avons effectué quelques essais avec les amines suivantes :

- amino-3-octane, HCl,
- cyclopentylamine, HCl,
- phényl-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2} H_2SO_4$,
- amino-1-diphényl-1,2-éthane, HCl.

Ces amines ont été déposées en quantité de 25 µg sur les supports ci-dessous :

- feuilles d'aluminium revêtues d'une couche mince de cellulose (DC - Alufolien Cellulose, Merck 5552),
- feuilles d'aluminium revêtues d'une couche mince de gel de silice (DC - Alufolien Kieselgel F 254, Merck 5554),
- feuilles "chromagram" revêtues d'une couche mince de gel de silice (Kodak, K 301-V),

et soumises à la chromatographie ascendante (butanol acétique). Les feuilles, rapidement immergées dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,5 %, sont séchées à température ambiante à l'obscurité. Les feuilles "chromagram", après 2 heures, ne montrent aucun spot coloré, et leur exposition à la lumiere est suivie d'une apparition très rapide de pourpre de Ruhemann qui, sur ce support, se présente sous la forme d'une tache rose. La réaction photochimique est également très nette sur les deux autres supports, mais elle nous a paru moins spécifique car, après le séjour de 2 heures à l'obscurité et avant l'irradiation, les amines sont déjà décelables sous forme de taches très faiblement colorées en rose, à la limite de la visibilité. Par irradiation, la coloration rose augmente considérablement (DC-Alufolien Kieselgel) ou vire au violet (DC-Alufolien Cellulose). Ces constatations nous conduisent à préférer, pour les applications analytiques, le simple papier de chromatographie classique aux autres supports, dont certains diminuent la spécificité de la réaction photochimique.

IV - COMPORTEMENT DE DIFFERENTES AMINES DANS LA REACTION PHOTOCHIMIQUE EN CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons groupé dans le tableau XVI les résultats obtenus en chromatographie sur papier avec 52 amines différentes, répondant toutes à la structure $(R,R')CH-NH_2$.

TABLEAU XVI

Chromatographie sur papier de diverses amines de type $(R,R')CH-NH_2$.

- chromatographie descendante sur papier Whatmann n° 1
- phase solvante : butanol, acide acétique, eau (12 : 3 : 5, vol/vol)
- dépôt : 25 µg de substance dans 10 µl d'eau
- révélation par une solution acétonique de ninhydrine à 0,5 %.

	Amine	Coloration du spot	
		Après 2h d'incubation à l'obscurité et avant exposition à la lumière	Après l'exposition à lallumière
Amines aliphatiques	isopropylamine, HCl	O	(V)
	DL-amino-2-butane, HCl	O	V
	DL-amino-2-pentane, HCl	O	(V)
	amino-3-pentane, HCl	O	V
	DL-amino-2-méthyl-4-pentane, $\frac{1}{2}H_2SO_4$	O	V
	DL-amino-2-heptane, $\frac{1}{2}H_2SO_4$	O	V
	DL-amino-3-heptane, HCl	O	V
	amino-4-heptane, HCl	O	V
	DL-amino-2-méthyl-4-hexane, HCl	O	V
	DL-amino-2-octane, HCl	O	V
	DL-amino-3-octane, HCl	O	V
	DL-amino-4-octane, HCl	O	V
	DL-amino-2-méthyl-6-heptane, $\frac{1}{2}H_2SO_4$	O	V
	DL-amino-2-dodécane, HCl	O	V
	DL-amino-6-méthyl-2-heptanol-2, HCl	O	V
	DL-(diéthylamino)-5-amino-2-pentane, 2HCl	O	V
Amines cyclaniques	cyclopropylamine, $\frac{1}{2}H_2SO_4$	O	J→(V)
	DL-cis-phényl-2-cyclopropylamine, HCl	V	V
	DL-trans-phényl-2-cyclopropylamine, HCl	V	V
	cyclopentylamine, HCl	O	V
	amino-1-indane, HCl	J	J→V (24h)
	amino-2-indane, HCl	O	(J)
	cyclohexylamine, HCl	O	V
	hydroxy-4-cyclohexylamine, HCl	O	V
	cycloheptylamine, HCl	O	(V)
	cyclo-octylamine, $\frac{1}{2}H_2SO_4$	O	V

Amines aliphatiques à substituant aromatique	DL-phényl-1-éthylamine, HCl	O	V
	DL-(n-propoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	O	J →br →br -V →V
	DL-(n-octoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	O	J →br →br -V →V
	DL-(phénoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	O	J →br →br -V →V
	éther di-(amino-1'-éthyl)-4-phénylique racémique, 2HCl	O	J →br →br -V →V
	DL-(méthoxy-4'-isopropoxy-3'-phényl)-1-éthylamine, HCl	O	J →br →br -V →V
	DL-(méthoxy-4'-cyclohexoxy-3'-phényl)-1-éthylamine, HCl	O	J →br →br -V →V
	DL-phényl-1-propylamine, HCl	O	V
	DL-β-phényl-β-alanine	O	O
	DL-phényl-1-butylamine, HCl	O	V
	benzhydrylamine, HCl	br	br-V →V
	DL-amino-1-diphényl-1,2-éthane, HCl	O	V
	DL-phényl-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2} H_2SO_4$	O	V
	DL-(hydroxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane, Hbr	O	V
	DL-(méthoxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2} H_2SO_4$	O	V
	DL-(méthoxy-3'-méthylènedioxy-4',5'-phényl)-1-amino-2-propane, HCl	O	V
	DL-(diméthoxy-2',5'-phényl)-1-amino-2-propane, HCl	O	V
	diphényl-1,3-amino-2-propane, HCl	J	V
	DL-amino-3-phényl-1-butane, HCl	O	V
Amines aliphatiques à substituant hétérocyclique	DL-(pyridyl-2')-1-éthylamine, 2HCl	br - or	br - V
	DL-(pyridyl-3')-1-éthylamine, 2HCl	(V)	V
	DL-(pyridyl-4')-1-éthylamine, 2HCl	V	V
	DL-(tétrazolyl-5')-1-éthylamine, 2HCl	V	V
	DL-α-méthyl-tryptamine, HCl	J	J →br - V
	DL-α-éthyl-tryptamine, acétate	O	br - V
	amino-3-quinuclidine, 2HCl	V	V

V = violette ; br = brunâtre ; J = jaune ;
or = orangée ; ( ) = coloration faible
O = pas de coloration.

D'une maniere générale, les amines examinées ont manifesté le même comportement que celui décrit plus haut pour le sulfate de phényl-1-amino-2-propane : aucune coloration n'apparaît pendant le séjour à l'obscurité, tandis que le pourpre de Ruhemann se forme au cours de l'irradiation lumineuse. Nous avons toutefois noté quelques exceptions que nous examinerons maintenant :

a) - certaines amines ont fourni du pourpre de Ruhemann pendant l'incubation à l'obscurité ; ce sont :

- la DL-cis-phényl-2-cyclopropylamine,
- la DL-trans-phényl-2-cyclopropylamine,
- la DL-(pyridyl-3')-1-éthylamine,
- la DL-(pyridyl-4')-1-éthylamine,
- la DL-(tétrazolyl-5')-1-éthylamine,
- et l'amino-3-quinuclidine.

Remarquons que toutes ces amines, étudiées en solution hydro-tertiobutanolique dans les conditions du protocole de la page 21, ont fourni, à des degrés divers, du pourpre de Ruhemann en l'absence d'irradiation lumineuse.

b) - la β-phényl-β-alanine, dont nous avons signalé plus haut la faible réactivité photochimique, par rapport à la phényl-1-propylamine, ne nous a pas permis d'observer la formation de pourpre de Ruhemann en chromatographie sur papier.

c) - entre ces deux types de comportements se situent des comportements intermédiaires plus nuancés :

- substances non révélées à l'obscurité, dont la tache se colore en jaune à la lumiere (amino-2-indane),
- substances non révélées à l'obscurité ; l'irradiation conduit à une tache jaune, qui vire progressivement au violet (cyclopropylamines ; diverses phényl-1-éthylamines substituées sur le noyau benzénique ; α-éthyltryptamine).

- substances se colorant en jaune à l'obscurité ; le jaune vire au violet pendant l'irradiation (amino-1-indane ; benzhydrylamine ; diphényl-1,3-amino-2-propane ; α-méthyltryptamine). La (pyridyl-2')-1-éthylamine, dont nous avons souligné le comportement particulier en phase liquide (voir p. 64), entre également dans ce groupe : la tache brun-orangé notée après le séjour du chromatogramme à l'obscurité vire également au violet pendant l'exposition à la lumière.

C H A P I T R E V

-:-:-:-:-:-:-:-:-

Interprétation des résultats.

Avant d'interpréter nos résultats, il est nécessaire de connaître le bilan de la réaction photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$: aussi étudierons-nous d'abord les produits de dégradation obtenus au cours de la réaction avec la ninhydrine.

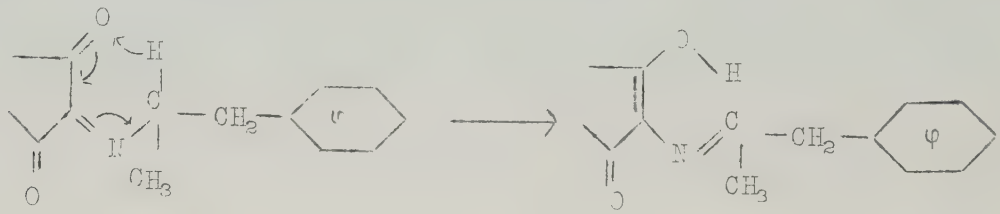
Apres avoir indiqué la nécessité de réaliser l'irradiation lumineuse sur la totalité du mélange réactionnel, nous décrirons les expériences que nous avons effectuées pour mettre en évidence un composé intermédiaire éventuel.

I - NATURE DES PRODUITS DE DEGRADATION

Dans l'introduction de notre travail nous avons rappelé le schéma réactionnel proposé par Neuzil et coll. pour expliquer la réaction des amines $R-CH_2-NH_2$ avec la ninhydrine (voir p. 9). Cette réaction, dont la phase principale est constituée par le départ prototropique d'un atome d'hydrogène du groupement $-CH_2-$, ne peut évoluer "spontanément" que dans le cas particulier où il reste effectivement deux atomes d'hydrogène sur le carbone voisin du groupement aminé. La formation de la base de Schiff produit à ce niveau un effet d'hyperconjugaison favorable au départ de cet atome d'hydrogène. On peut penser qu'avec une amine $(R,R')CH-NH_2$, dans laquelle aucun des deux radicaux R et R' ne peut céder de proton, le départ de l'atome d'hydrogène unique du carbone voisin du groupement aminé s'effectuera sous l'influence d'un apport énergétique extérieur. Cet apport peut être thermique : les amines $(R,R')CH-NH_2$, dans la technique habituelle de chromatographie sur papier qui met en oeuvre un chauffage du chromatogramme à l'étuve à 100°C, four-

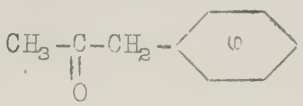
nissent effectivement des spots colorés à la suite de la formation de pourpre de Ruhemann. On peut penser que l'énergie apportée par les photons au cours de l'irradiation produit le même effet.

Pour l'amphétamine, la transformation de la base de Schiff formée dans un premier temps s'effectuerait donc selon le schéma ci-dessous :



I II

qui correspond au passage de la cétimine I à la cétimine II. L'hydrolyse ultérieure de cette dernière cétimine libèrerait, à côté de l'amino-2-indanedione-1,3 précurseur du pourpre de Ruhemann, la phénylacétone :



Nous avons pu effectivement caractériser la phénylacétone au cours de la la réaction de la ninhydrine avec l'amphétamine. Toutefois, en raison du faible rendement de la réaction photochimique, nous avons dû effectuer cette caractérisation sur un milieu réactionnel plus concentré que celui que nous utilisons normalement et dans lequel la réaction était déclenchée par chauffage. Nous avons donc chauffé au bain-marie la solution suivante :

- sulfate d'amphétamine ..... 0,92 g (5mmoles)
- eau ..... 10 ml ,

Quand la solution a atteint la température du bain-marie on ajoute :

- ninhydrine ..... 1,78 g (10mmoles)
- eau ..... 10 ml,

et l'on ferme le ballon avec un réfrigérant à reflux.

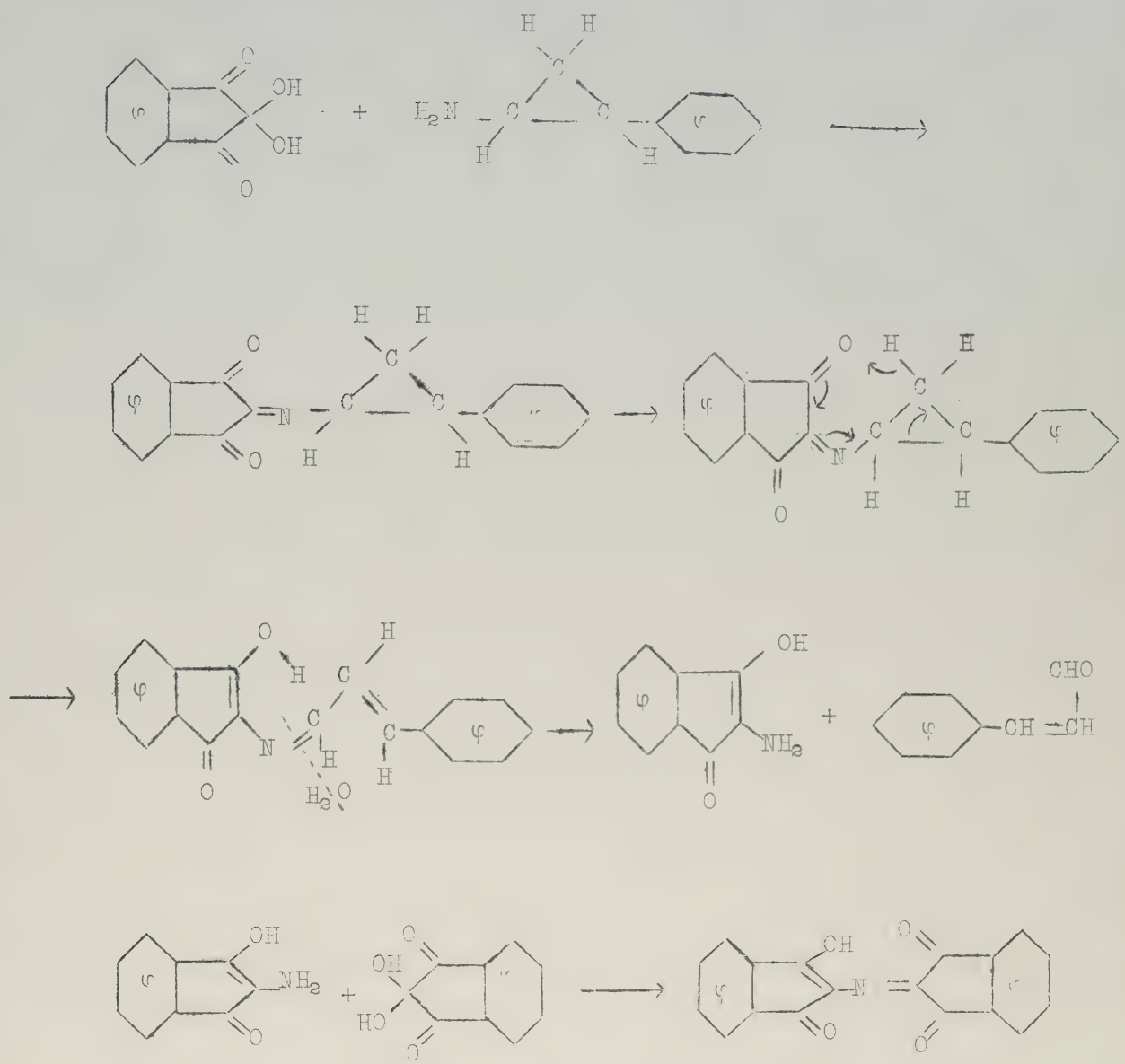
Au cours du chauffage, le milieu réactionnel se colore progressivement en violet. Après 30 minutes de chauffage on inverse le réfrigérant et l'on recueille 5 ml de distillat auquel on ajoute 10 ml d'une solution de dinitro-2,4-phénylhydrazine dans HCl 2N. Il se forme immédiatement un précipité rouge qui est recueilli par centrifugation, lavé avec HCl 2N puis à l'eau distillée. Après séchage le précipité, dissous dans le chloroforme, est soumis à la chromatographie sur couche mince de gel de silice.

On constate que le précipité obtenu n'est pas homogène (figure 29) : il fournit une tache jaune possédant le même Rf que celui de la dinitro-2,4-phénylhydrazone de la méthylbenzylacétone que nous avons préparée par la méthode classique. Cette tache jaune (Rf = 0,90 dans toluène, acétate d'éthyle 3 : 1 vol/vol ; Rf = 0,77 dans benzène, acétate d'éthyle 95 : 5 vol/vol) est accompagnée d'une tache orangée de Rf inférieur, qui correspond à l'une des quatre dinitro-2,4-phénylhydrazones de la ninhydrine [54], qui se trouve entraînée particulièrement au cours de la distillation.

La même expérience, réalisée en présence de tampon phosphate (KH_2PO_4, M/7,5 et HNa_2PO_4, M/7,5), nous a permis d'obtenir plus rapidement la coloration violette, qui apparaît dès l'addition de la solution de ninhydrine. Le précipité obtenu à partir du distillat est beaucoup plus important, mais son analyse chromatographique ne nous a pas apporté de données supplémentaires : la tache de la dinitro-2,4-phénylhydrazone de la phénylacétone est toujours accompagnée de celle correspondant à la ninhydrine, cette dernière étant parfois dédoublée dans quelques essais.

Nous avons signalé que la trans-phényl-2-cyclopropylamine, malgré sa structure d'amine du type $(R,R')CH-NH_2$, réagit avec la ninhydrine sans intervention lumineuse (voir p. 64). Cette exception n'est qu'apparente et provient en réalité de la faible stabilité du cycle cyclopropanique : nous avons pu, en effet, caractériser la formation d'aldéhyde cinnamique au cours de la réaction [48, 49], qui peut donc être

comprise selon le schéma ci-dessous :



II - REMARQUES SUR LES MODALITES D'IRRADIATION

Dans le chapître II, nous avons déja étudié l'influence du temps d'irradiation. Il convient de préciser que la réaction photochimique conduisant à la formation du pourpre de Ruhemann n'est décelable que si l'irradiation intéresse la totalité du mélange réactionnel.

Nous avons en effet effectué quelques essais dans lesquels les produits initiaux, ninhydrine ou amphétamine, avaient été soumis à des irradiations préalables, comme l'indique le protocole expérimental ci-dessous :

- on prépare une solution mère (N_o) de ninhydrine à 6,25 µmole/ml dans un mélange hydro-alcoolique comportant 3 vol. de butanol tertiaire et 1 volume de tampon phosphate (H_2KPO_4, M/30 ; HNa_2PO_4, M/30). Une partie de cette solution est soumise à une irradiation lumineuse, dans nos conditions habituelles, pendant 1 heure : la solution irradiée est appelée N_i.

- on prépare parallèlement une solution mère d'amphétamine à 3,125 µmole/ml (A_o) dans le même solvant ; on en irradie pendant une heure une fraction (A_i).

On réalise ensuite les quatre mélanges suivants, en mélangeant à parties égales les différentes solutions :

$N_o + A_o$
$N_o + A_i$
$N_i + A_o$
$N_i + A_i$

On irradie ensuite les quatre mélanges pendant une heure : leur comportement est absolument identique et donne lieu à une très faible production de pourpre de Ruhemann (densité optique = 0,075).

Dans une autre expérience les quatre mélanges, après les irradiations préalables séparées, ont été maintenus 18 heures à l'obscurité ; après ce séjour en chambre noire, les mélanges sont restés incolores. Leur irradiation ultérieure fournit une grande quantité de pourpre de Ruhemann qui est absolument la même dans les quatre mélanges (densité optique = 0,410).

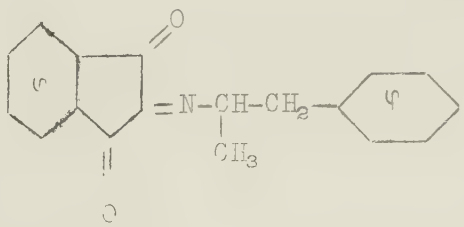
Ceci montre clairement que l'irradiation préalable de l'un ou l'autre des deux réactifs n'apporte aucune modification à la réaction

photochimique. Il est nécessaire que cette irradiation intéresse une solution contenant les deux produits.

Soulignons, d'autre part, l'influence primordiale de la durée de l'incubation à l'obscurité, que nous avons détaillée également dans le chapître II (voir p. 30). Les expériences décrites plus haut ont été réalisées dans un milieu renfermant 75 % de butanol tertiaire. Des essais complémentaires nous ont montré que si l'incubation est réalisée en milieu purement aqueux, l'addition d'alcool butylique tertiaire étant effectuée au moment même où commence l'irradiation, les résultats sont absolument différents : nous avons confirmé ce point par une nouvelle expérience dans laquelle la ninhydrine et l'ortédrine en solution aqueuse tamponnée sont mises en présence à l'obscurité, pendant des temps variant de 0 à 32 heures. On ajoute alors du butanol tertiaire de façon à réaliser une concentration en alcool de 75 %. Après 10 heures, tous les mélanges sont irradiés : on observe que la formation du pourpre de Ruhemann s'effectue exactement avec la même vitesse dans le mélange où la solution aqueuse de l'amine et de la cétone est restée 32 heures à l'obscurité en l'absence de butanol tertiaire et dans le mélange où ce temps d'incubation préalable a été supprimé.

Ceci nous incite à admettre que pendant le séjour à l'obscurité, une réaction lente s'est produite, et que cette réaction, favorisée par la présence d'alcool butylique tertiaire, conduit à la formation d'un intermédiaire sur lequel portera ultérieurement la réaction photochimique.

On peut penser que cet intermédiaire est constitué par la base de Schiff, dont la structure, dans le cas de l'amphétamine, serait la suivante :



La formation de la base de Schiff nécessite que l'amine réagisse sous sa forme neutre et non sous sa forme ionique. La présence de cette forme neutre est favorisée :

- par l'addition d'alcool butylique tertiaire, solvant alcoolique donnant des solutions de constante diélectrique particulièrement basse [7].
- par l'augmentation du pH : rappelons qu'on peut observer la réaction photochimique même en l'absence de phosphate lorsqu'on met en oeuvre l'amine base et non son sel.

Ceci nous entraîne à chercher à mettre en évidence ce composé intermédiaire.

III - MISE EN EVIDENCE D'UN COMPOSE INTERMEDIAIRE

Nous avons recherché l'existence de ce composé intermédiaire par deux types de techniques :

- la technique spectrophotométrique,
- la technique chromatographique.

1°) - Etude spectrophotométrique du milieu soumis à l'incubation à l'obscurité

Ces expériences ont été réalisées avec le sulfate d'amphétamine, dans les conditions de notre protocole habituel (voir p. 21). A différents temps apres la réalisation du mélange que l'on maintient à l'obscurité, à la température de 20°C ou à la température de 40°C, on enregistre le spectre d'absorption au spectrophotomètre automatique Unicam SP 800.

Les modifications spectrales les plus importantes se produisent dans la gamme 275-400 nm, zone dans laquelle l'amphétamine ne présente aucune absorption notable. Des la réalisation du mélange, le

spectre d'absorption est pratiquement le même que celui observé dans une simple solution de ninhydrine. Au cours de l'incubation, à la température ambiante et surtout à 40°C, apparaît une augmentation de la densité optique particulièrement visible à λ = 306 nm et λ = 322 nm, comme le montre la figure 30.

Dans la figure 31, nous avons indiqué les variations de la densité optique du milieu réactionnel à λ = 322 nm, aux deux températures de 20°C et de 40°C ; nous avons également rappelé sur cette figure les tracés de la figure 8 (voir p. 30) qui rappellent l'influence du temps d'incubation à l'obscurité sur la formation photochimique du pourpre de Ruhemann.

On est frappé par la similitude de ces tracés : l'influence du temps d'incubation à l'obscurité sur les deux phénomènes est assez voisine.

L'augmentation importante de la densité optique à λ = 322 nm paraît bien correspondre à la formation du composé intermédiaire à partir duquel s'effectue la synthèse du pourpre de Ruhemann : en effet, après irradiation lumineuse, on observe des changements dans le spectre d'absorption, qui se traduisent non seulement par l'apparition des maximums d'absorption à λ = 400 et 570 nm du pourpre de Ruhemann, mais également par une diminution de la densité optique à λ = 322 nm (figure 32).

Il aurait été intéressant de déterminer le spectre d'absorption du composé intermédiaire mais les conditions expérimentales ne nous ont pas permis d'obtenir ce résultat. Une autre méthode permet de déterminer le spectre d'action de ce produit. Pour cela le mélange réactionnel est irradié à diverses longueurs d'onde dans la bande d'absorption supposée du composé intermédiaire. Pour chaque valeur de λ on détermine la quantité de pourpre de Ruhemann formée, les résultats étant naturellement rapportés à une énergie lumineuse incidente cons-

tante. Pour réaliser cette étude (*), nous avons utilisé un appareil permettant d'effectuer des irradiations à longueurs d'onde variables. Il est constitué d'un monochromateur à réseau du type Safas ; la source lumineuse est un arc au xénon de 150 watts. L'intensité du faisceau lumineux est déterminée à l'aide d'une thermopile (**) reliée à un galvanomètre. Une série de solutions, préparées selon le protocole de la page 21, sont maintenues à l'obscurité pendant 24 heures. Puis elles sont irradiées individuellement pendant 1 heure à différentes longueurs d'onde. La quantité de pourpre de Ruhemann formée dans chaque cas est déterminée en mesurant la densité optique à λ = 570 nm. Pour chaque valeur de la bande passante ($\Delta\lambda$ = 100 Å) nous mesurons avant irradiation l'intensité du faisceau lumineux après traversée d'une cuve en quartz de 1 cm contenant le solvant.

Pour connaître la densité optique à énergie incidente constante il nous suffit alors d'effectuer une règle de trois en prenant une longueur d'onde de référence. Nous avons choisi λ = 320 nm, valeur correspondant au maximum de la bande obtenue. Dans ces conditions si on désigne par :

- Ir la déviation du galvanomètre à λ = 320 nm,
- I la déviation du galvanomètre à λ d'irradiation,
- d la densité optique à λ = 570 nm,

la densité optique d_E que l'on aurait obtenue en opérant à énergie incidente constante est donnée par la relation :

$$d_E = \frac{d \times Ir}{I}$$

(*) Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Physique de la Faculté des Sciences.

(**) Thermopile Schwarz FT16.

Les résultats obtenus sont groupés sur la figure 33.

La courbe obtenue qui a vraisemblablement l'allure du spectre d'absorption du composé intermédiaire, présente un maximum à λ= 320 nm ce qui confirme les résultats antérieurs.

2°) - Etude chromatographique

Nous avons cherché à mettre en évidence le composé intermédiaire sur lequel porterait la réaction photochimique en séparant les constituants du mélange réactionnel par chromatographie.

Une première expérience a été réalisée avec le mélange ninhydrine amphétamine qui nous sert de témoin : après 24 heures d'incubation à l'obscurité et à 20°C, on dépose, toujours à l'obscurité, 50 µl de ce mélange sur une feuille de papier Whatman n° 1 et l'on procède à la séparation chromatographique avec la phase solvante :

n-butanol	2 vol
éthanol	1 vol
eau	2 vol

La cuve chromatographique est maintenue dans une pièce obscure pendant la migration du solvant. Après séchage à l'air libre et à l'obscurité, aucune tache colorée n'est visible sur le chromatogramme. Si on le soumet alors à l'irradiation lumineuse, on observe l'apparition d'une tache violette, au niveau correspondant à celui de la ninhydrine (Rf = 0,81). Le témoin ninhydrine, chromatographié dans les mêmes conditions, ne donne aucune coloration à la suite de l'irradiation (figure 34 A).

Nous avons répété la même séparation chromatographique mais, après séchage, le chromatogramme a été rapidement trempé dans une solution de ninhydrine à 0,5 % dans l'alcool butylique tertiaire. Par irradiation lumineuse, une tache violette importante correspondant à l'amphétamine se manifeste rapidement (Rf = 0,72). Elle est surmontée d'une traînée violette qui atteint le front du solvant.

Nous pensons que cette traînée correspond à la formation de la base de Schiff, composé intermédiaire de la réaction ; cette base de Schiff ne peut évoluer spontanément ou par irradiation vers la formation de pourpre de Ruhemann car la synthèse de celui-ci nécessite la présence d'une molécule supplémentaire de ninhydrine. Aussi, lorsque le chromatogramme n'est pas soumis à la révélation à la ninhydrine, n'observe-t-on la formation du pourpre de Ruhemann que dans la seule région où la traînée se superpose à l'emplacement de la ninhydrine qui n'a pas participé à la réaction (voir rendement, p.28). En présence de l'excés de ninhydrine dû à l'immersion dans ce réactif, on observe la réaction photochimique sur l'ensemble de la traînée, comme d'ailleurs au niveau de la tache correspondant à la seule amphétamine.

L'utilisation d'une autre phase solvante confirme les résultats ci-dessus. En effet, en développant la chromatographie avec le mélange :

- alcool benzylique ..... 80 vol
- n-butanol ..... 15 vol
- eau ..... 5 vol

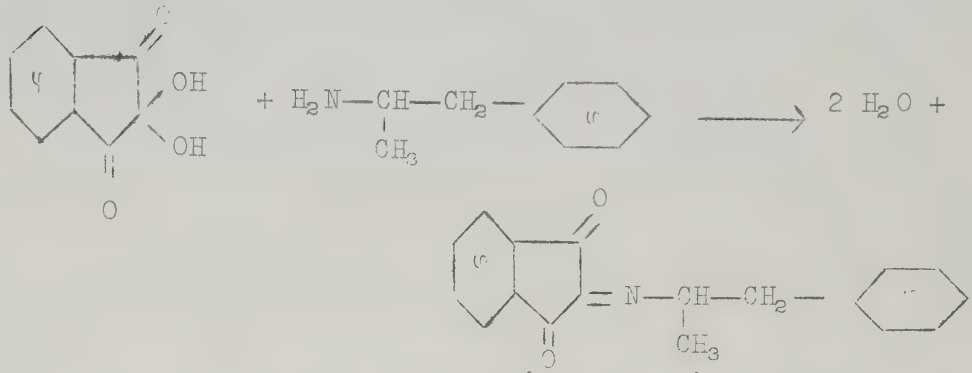
on sépare parfaitement l'amphétamine (R_f = 0,0), la ninhydrine (R_f = 0,73 à R_f = 0,98) et la base de Schiff (traînée de R_f = 0,36 à R_f = 0,65) (figure 34 B). L'irradiation du chromatogramme après la séparation ne donne pas naissance au pourpre de Ruhemann, puisqu'on n'observe ici aucun chevauchement de la ninhydrine et de la base de Schiff. Le colorant violet apparaît au contraire facilement après immersion du chromatogramme dans une solution de ninhydrine et irradiation, au niveau de l'amphétamine et du composé intermédiaire, tout comme dans l'expérience précédente.

IV - MECANISME DE LA REACTION PHOTOCHIMIQUE

La mise en évidence d'un composé intermédiaire dans la réaction photochimique de l'amphétamine avec la ninhydrine nous permet de supposer que la réaction s'effectue en deux étapes distinctes. On peut

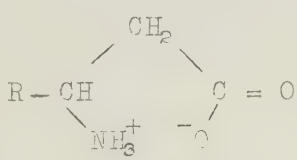
proposer le mécanisme réactionnel qui est décrit ci-dessous.

Le premier stade de la réaction consisterait en la formation de la base de Schiff, selon le schéma :



Comme nous l'avons souligné, cette réaction s'effectue plus facilement avec l'amine non dissociée qu'avec le sel correspondant, d'où l'effet favorable de l'alcalinisation du milieu, de la présence de l'alcool butylique tertiaire (solvant dont la faible constante diélectrique diminue l'ionisation de l'amine), et de la longueur de la chaîne carbonée (l'amino-2-heptane, base plus faible que l'isopropylamine, est donc moins ionisé que cette dernière dans les mêmes conditions de milieu).

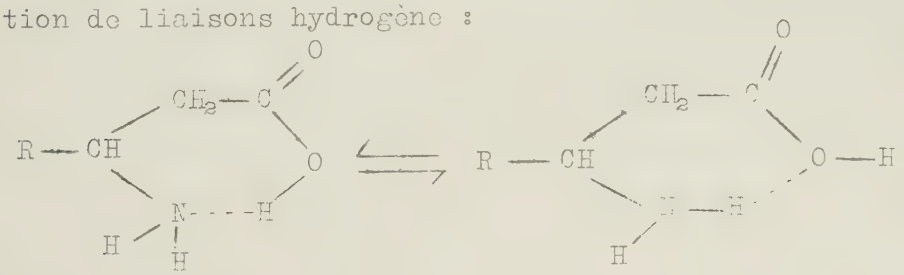
L'obtention de la base de Schiff est plus difficilement réalisable avec des substances comme la β-phényl-β-alanine, et surtout l'acide amino-3-butyrique, composés dans lesquels le groupement aminé participe à la formation d'un sel interne du type suivant :



R = CH_3- : acide amino-3-butyrique

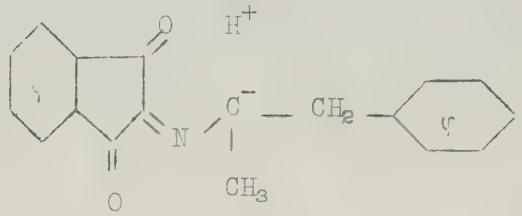
R = C_6H_5-: β-phényl-β-alanine

ou d'une structure pseudocyclique hexagonale stabilisée par la formation de liaisons hydrogène :



L'action favorisante de divers alcools dans le milieu réactionnel, et notamment de l'alcool butylique tertiaire (surtout pour des concentrations élevées), peut s'expliquer parce que ces composés facilitent l'élimination d'eau au cours de la réaction de formation de la base de Schiff.

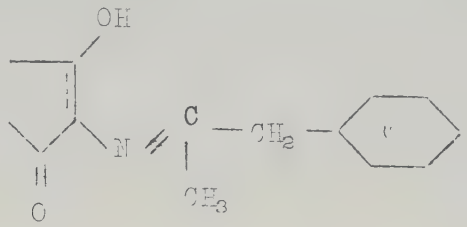
Le deuxième stade comporterait le départ de l'hydrogène du carbone voisin du groupement azoté, selon le schéma donné page 79. Nous pensons que l'atome d'hydrogène quitte la molécule sous forme de proton. La réaction serait donc plus aisée dans un milieu alcalin, confirmant ainsi l'effet favorable de la neutralisation des sels d'amine. D'autre part, ce schéma implique la formation d'un carbanion dont l'apparition de la charge négative est favorisée par les groupements nu-



cléophiles, en particulier par le groupement méthyle. L'influence si favorable du groupement isopropyle et surtout du groupement tertio-butyle (voir p. 52) s'explique de la même manière. Rappelons que la présence d'un groupement hydroxylé (électrophile) au voisinage du groupement isopropyle, s'accompagne d'une réactivité plus faible de l'amine (voir p. 52). Ces influences électroniques ne sont plus perceptibles lorsque la chaîne est trop longue (figure 21).

Le départ de l'atome d'hydrogène est facilité par la présence du noyau benzénique : nous avons signalé que l'α-méthylbenzylamine donne une réaction photochimique plus importante que l'amphétamine et que la benzhydrylamine réagit spontanément avec la ninhydrine sans excitation photochimique. Ces résultats peuvent être interprétés par l'effet de conjugaison au niveau de la liaison C-H qu'entraîne la présence de ce noyau benzénique. Ici encore, l'influence favorable du cycle benzénique s'estompe avec son éloignement (voir p. 57).

Le départ du proton est suivi de l'attaque par ce dernier du groupement carbonylé de la ninhydrine, et conditionne le passage à la cétimine ci-dessous :



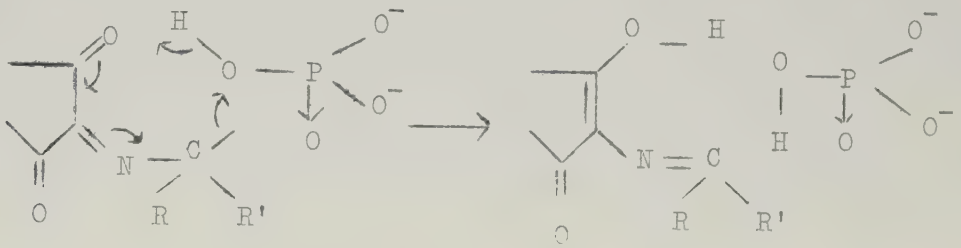
autre base de Schiff dont l'hydrolyse conduit à la phénylacétone et à l'amino-2-indanedione-1,3.

La formation de pourpre de Ruhemann n'ayant lieu qu'après incubation il semble probable que l'action de la lumière intéresse spécifiquement le départ de l'atome d'hydrogène. Il n'y aurait donc aucune différence essentielle entre la réaction spontanée d'une amine $R-CH_2-NH_2$ avec la ninhydrine et la réaction avec cette même tricétone d'une amine $R-\underset{\underset{R'}{|}}{CH}-NH_2$: il faut amener dans le milieu une énergie suffisante pour rendre ce départ possible. Celle-ci peut provenir de la base de Schiff elle-même, dont la tautomérisation conduit à une forme dont l'énergie libre est plus basse ; elle peut être également fournie par chauffage ou par voie photochimique.

Le schéma réactionnel que nous proposons n'est pas le seul que l'on puisse imaginer. L'influence favorisante des alcools peut également être interprétée par la participation des composés hydroxylés à une réaction du type "push-pull", de transfert circulaire électronique selon le schéma ci-dessous :

Toutefois un tel schéma ne permet pas de comprendre la raison pour laquelle l'alcool butylique tertiaire est plus efficace dans la réaction photochimique que les alcools primaires, bien que le départ de l'atome d'hydrogène soit plus facile avec cette dernière catégorie d'alcools.

Nous avons enfin insisté sur l'effet favorisant des ions phosphate , que l'on peut également interpréter par une réaction du même type, reposant sur un transfert électronique circulaire à 8 sommets :



Rappelons que les ions phosphate ne sont toutefois pas indispensables à la formation du pourpre de Ruhemann, puisque les amines examinées sous la forme des bases correspondantes conduisent à la réaction photochimique en leur absence.

C O N C L U S I O N S

La ninhydrine, hydrate du tricétoindane, réagit avec de nombreux composés possédant une fonction amine primaire en donnant une intense coloration violacée due à la formation de l'anion de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine ou pourpre de Ruhemann. La structure moléculaire de l'amine primaire, comme nous l'avons rappelé dans la première partie de cette thèse, influe sur la réactivité du composé azoté : les amines du type $(R,R')CH-NH_2$, dans lesquelles les radicaux R et R' ne sont pas protonisables, fournissent avec la ninhydrine une réaction particulièrement faible. Lorsque l'on opère à la température ambiante et à l'obscurité, dans des conditions de milieu nettement précisées, la coloration bleu-violacée caractéristique ne peut-être obtenue, même après un temps d'incubation prolongé. Le pourpre de Ruhemann se forme toutefois si l'on expose à la lumière le mélange réactionnel préalablement incubé à l'obscurité. C'est l'étude de ce phénomène qui constitue l'objet de ce travail, et l'ensemble de nos recherches représente la deuxième partie de notre thèse.

Apres avoir, dans un premier chapître, précisé les conditions opératoires que nous avons sélectionnées, nous consacrons le chapître II à l'étude de la réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane : l'amphétamine en effet constitue un excellent exemple d'amine de structure $(R,R')CH-NH_2$ et nous a servi d'étalon interne pour l'ensemble de notre expérimentation.

Nous examinons successivement l'influence du temps d'irradiation puis l'influence de la concentration en amphétamine et en ninhydrine. La formation de pourpre de Ruhemann ne correspond qu'à une évolution partielle de la réaction, puisque le rendement, calculé par rapport à l'amphétamine, ne s'élève qu'à 1,8%. Nous avons étudié l'influence du temps de contact et de la température pendant l'incubation à l'obscurité, ainsi que l'influence de la concentration en alcool dans le milieu. L'alcool butylique tertiaire s'avère particulierement favorable

grande solubilité avec l'eau permet de l'utiliser jusqu'à des concentrations très élevées. La présence de divers sels minéraux, et en particulier de phosphates, augmente la vitesse de formation du pourpre de Ruhemann ; mais en réalité ces phosphates n'agissent qu'en augmentant l'alcalinité du milieu, facteur important de la réaction photochimique. Parmi les différentes polycétones utilisées comme réactif de la fonction amine, seul un produit de substitution de la ninhydrine, la benzo-5,6-indanetrione-1,2,3, nous a permis d'observer une réaction photochimique comparable.

Le troisième chapître rassemble nos investigations sur le rôle de la structure moléculaire de l'amine de type $(R,R')CH-NH_2$ mise en jeu. Nous avons mis en évidence l'influence particulièrement favorable du noyau benzénique et de l'accumulation de groupements méthyle au voisinage de la fonction amine. Au cours de cette étude, nous avons relevé quelques exceptions : certains composés, comme par exemple l'acide β-aminobutyrique, ne donnent pas la réaction photochimique ; tandis que d'autres amines du type $(R,R')CH-NH_2$, en particulier la benzhydrylamine et la phényl-1-cyclopropylamine, réagissent avec la tricétone sans excitation photochimique ; nous avons fourni l'explication de ces diverses exceptions.

Le chapître IV constitue l'application pratique de notre étude antérieure : nous proposons une technique permettant de distinguer la plupart des amines $(R,R')CH-NH_2$ des composés RCH_2-NH_2 en chromatographie de partage. Le principe utilisé consiste à effectuer la révélation classique à la ninhydrine, en maintenant le chromatogramme à la température ambiante et à l'obscurité, et à l'examiner avant puis après une irradiation lumineuse importante. Après deux heures de contact à l'obscurité les spots des amines RCH_2-NH_2 se montrent colorés tandis que ceux des amines $(R,R')CH-NH_2$ ne sont pas visibles ; ils apparaissent au cours de l'exposition à la lumière. Nous avons évalué la limite de détection des composés les moins réactifs, dans les conditions expérimentales retenues.

Le dernier chapître de notre travail nous donne l'occasion d'interpréter nos résultats. La mise en évidence des produits de dégradation obtenus nous a conduit à proposer un mécanisme réactionnel qui repose sur la formation d'un composé intermédiaire. Ce dernier produit, base de Schiff résultant de l'interaction de l'amine et de la ninhydrine, a pu être mis en évidence par deux techniques différentes, spectrophotométrique et chromatographique ; nous avons pu montrer également que c'est sur ce composé intermédiaire que porte la stimulation photochimique.

B I B L I O G R A P H I E

1.- ADAMS (M.), BLOIS (M.S. Jr.) et SANDS (R.H.).- Paramagnetic resonance spectra of some semiquinone free radicals.
J. Chem. Phys., 1958, 28, 774-776.

2.- ANDERSON (D.M.W.), BELLAMY (L.J.) et WILLIAMS (R.L.).- The infrared spectra of some gem dihydroxy compounds and their deuterated derivatives.
Spectrochim. Acta, 1958, 12, 233-238.

3.- BECKER (H.D.).- Preparation and rearrangement reactions of 2-methylsulfinylindanedione-1,3. The mechanism of the new ninhydrin synthesis.
J. Org. Chem., 1964, 29, 1358-1362.

4.- BECKER (H.D.) et RUSSEL (G.A.).- Reactions of resonance stabilized carbanions. VII. Synthesis of ninhydrin.
J. Org. Chem., 1963, 28, 1896.

5.- BOLTON (W.).- The crystal structure of triketoindane (anhydrous ninhydrin). A structure showing close C = O .... C interactions.
Acta Cryst., 1965, 18, 5-10.

6.- BOURHIS (Mme M.), JENSEN (Mme H.) et NEUZIL (E.).- Recherches sur l'orthodiacétylbenzène, réactif des aminoacides et des amines. Influence de la structure du composé aminé.
Ann. pharm. franç., à paraître in.

7.- BRETON (J.C.).- Etudes chimiques et biologiques sur la ninhydrine, réactif des aminoacides. Thèse Doct. Méd., n° 53, Bordeaux, 1957, 1 vol., 285 p., Impr. E. Drouillard édit. Bordeaux, 1958.

8.- BROSSARD (B.) et BOICHARD (J.) (Rhône Poulenc S.A.).- Ninhydrin.
Brev. Franc., n° 1.348.567, 10 janv. 1964.

9.- BRUICE (T.C.) et RICHARDS (F.M.).- Reaction of cyanide with triketohydrindane hydrate (Ninhydrin).
J. Org. Chem., 1958, 23, 145-146.

10.- DOMINGUEZ (X.A.).- The preparation of ninhydrin as a laboratory experiment.
J. chem. Educ., 1953, 30, 624-625.

11.- EGASHIRA (S.).- Improved preparation of ninhydrin.
Nippon Kagaku Zasshi, 1954, 75, 308-309.

12.- FOWDEN (L.).- The quantitative recovery and colorimetric estimation of aminoacids separated by paper chromatography.
Biochem. J., 1951, 48, 327-333.

13.- GAUMET (J.L.).- Interprétation des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire de quelques dérivés de la ninhydrine et de composés de structure indane.
Thèse Doct. Chim. Bordeaux 1969.

14.- GUSTOWSKI (W.L.).- Syntheza ninhydrin.
Przemysl Chem., 1951, 7, 694-696.

15.- HAMILTON (P.B.) et ORTIZ (P.J.).- Purification of ninhydrin by cristallization.
Anal. Chem., 1950, 22, 948.

16.- HARDY (T.L.), HOLLAND (D.O.) et NAYLER (J. H.C.).- One-phase solvent mixtures for the separation of aminoacids.
Anal. Chem., 1955, 27, 971-974.

17.- JACOBS (S.).- The determination of aminoacids by ion exchange chromatography using a modified Moore and Stein technique and an improved photometric method.
In Résumé des Communications du XVe Congrés de Chimie pure et appliquée, Lisbonne 1956, 1 vol., 323 p.; sec. VIII, p. 212

18.- JACOBS (S.).- An improved method for the quantitative determination of aminoacids by means of indanetrione hydrate.
Analyst., 1956, 81, 502-503.

19.- JENSEN (Mme H.), BOURHIS (Mme M.) et NEUZIL (E.).- Recherches sur l'orthodiacétylbenzene, réactif des groupements aminés. Influence du milieu réactionnel.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1969, 108, 177-186.

20.- LABADIE (M.), NEUZIL (E.) et BRETON (J.C.).- Analyse chromatographique de la réaction des aminoacides avec la ninhydrine. I. Groupe de la phénylalanine.
Bull. Soc. Chim. biol., 1965, 47, 11, 2125-2144.

21.- LETORT (M.).- Cinétique de la décomposition thermique de la vapeur d'acétaldéhyde.
C.R. Acad. Sc., 1934, 199, 351-353.

22.- Mc CALDIN (D.J.).- The chemistry of ninhydrin.
Chem. Rev., 1960, 60, 39-51.

23.- Mc FADYEN (D.A.).- On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α-aminoacids. I. Absorption spectra of ninhydrin and certain derivatives.
J. biol. Chem., 1950, 186, 1-12.

24.- MEDRUD (R.C.).- Etude cristallographique de la ninhydrine.
Acta Cryst., 1969, B25, 213.

25.- MEIER (R.) et LOTTER (H.G.).- Uber Benzo. und Naphthoindantrione.
Chem. Ber., 1957, 90, 222-228.

26.- MELKONIAN (G.A.) et HOLLECK (L.).- Kinetic der Umwandlung des Ninhydrins in Alkalischem.
Z. Elektrochem., 1960, 64, 1210-1214.

27.- MEYER (H.).- The Ninhydrin reaction and its analytical applications.
Biochem. J., 1957, 67, 333-340.

28.- MIZELL (M.) et SIMPSON (S.B. Jr.).- Paper chromatographic separation of aminoacids. A solvent to replace phenol.
J. Chromatog., 1961, 5, 157-160.

29.- MOORE (S.) et STEIN (W.H.).- Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of aminoacids.
J. biol. Chem., 1948, 176, 367-388.

30.- MOUBASHER (R.) et IBRAHIM (M.).- Studies on indene derivatives. Part V.
J. chem. Soc., 1949, 702-703.

31.- NEUZIL (E.).- Mises au point de chimie analytique, 1970, 19e série, sous presse.

32.- NEUZIL (E.) et BRETON (J.C.).- Réactivité du groupement aminé de la D-cyclosérine avec la ninhydrine.
In vol. du IXe Congrés des Sociétés de pharmacie de France, Clermont-Ferrand, 1957, 292 p. ; p. 97-105.

33.- NEUZIL (E.) et BRETON (J.C.).- Propriétés chimiques de la D-cyclosérine ; la réactivité de son groupement amine primaire avec quelques composés carbonylés.
Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1957, 5, 240-250.

34.- NEUZIL (E.) et BRETON (J.C.).- Réaction colorée de quelques amino-4-isoxazolidinones-3 avec la ninhydrine.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1960, 99, 91-107.

35.- NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et JOSSELIN (J.).- Facteurs structuraux et réaction colorée de quelques oligopeptides avec la ninhydrine.
In Résumés des Communications du XVIIe Congrés international de chimie pure et appliquée, Munich 1959, t. II, 1 vol., 115 p. ; p. 59.

36.- NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- Réactivité de la ninhydrine en présence d'alcools aliphatiques. II. La forme "active" de la ninhydrine.
Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1958, 6, 162-168.

37.- NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction colorée ninhydrine-aminoacides en présence d'alcool butylique tertiaire ; influence de la structure de l'aminoacide.
Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1958, 6, 169-195.

38.- NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire. Nouveaux résultats.
Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1959, 7, 157-194.

39.- NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction colorée ninhydrine-composés aminés en présence d'alcool butylique tertiaire. Essais d'interprétation.
Bull. Mém. Ecole nat. Méd. Pharm. Dakar, 1959, 7, 195-211.

40.- NEUZIL (E.), BRETON (J.C.) et PLAGNOL (H.).- La réaction ninhydrine-aminoacides en présence d'alcools aliphatiques. Etude des solutions hydro-alcooliques de la ninhydrine. in Colloque de Biophysique 1 vol., 384 p., SEDES édit., Paris 1961, p. 287-300.

41.- NEUZIL (E.), JENSEN (Mme H.) et HERVIEU (Mme J.).- Solubilité de la ninhydrine dans l'eau.
Bull. Soc. chim. France, 1968, 2b, 12.

42.- NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.) et BRETON (J.C.).- Action favorisante de la lumiere sur la réaction de certaines amines avec la ninhydrine.
C.R. Acad. Sc., 1961, 252, 119-121.

43.- NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.) et BRETON (J.C.).- Hémicétals du tricétoindane.
Bull. Soc. chim. France, 1964, 1,9.

44.- NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.), JENSEN (Mme H.) et HERVIEU (Mme J.).- Réaction de la ninhydrine avec les thiocyanates alcalins.
Bull. Soc. chim. france, 1966, 1, 1173.

45.- NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.), JENSEN (Mme H.) et HERVIEU (Mme J.).- Un nouvel aspect de la réactivité des thiocyanates alcalins. Leur réaction avec la ninhydrine.
Bull. Soc. chim. France. 1970, a paraître in.

46.- NEUZIL (E.), JOSSELIN (J.) et VIDAL (Mme Y.).- Réaction photochimique de caractérisation des amines de structure $(R,R')CH-NH_2$ en chromatographie.
J. Chromatog., 1970, à paraître in.

47.- NEUZIL (E.), LIERMAIN (Mlle A.), JENSEN (Mme H.) et HERVIEU (Mme J.) Nouveaux modes de formation de la ninhydrine.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1968, 107, 105-112.

48.- NEUZIL (E.), PAUC (Mlle A.) et VIDAL (Mme Y.).- Désamination de la phényl-2-cyclopropylamine par la ninhydrine.
Pharmacia mediterranea, 1966, 6, 249-261.

49.- NEUZIL (E.), PAUC (Mlle A.) et VIDAL (Mme Y.).- Réaction de quelques cyclopropylamines substituées avec la ninhydrine.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1967, 106, 60-64.

50.- NEUZIL (E.), PAUC (Mlle A.) et VIDAL (Mme Y.).- Réaction des dipeptides à Valine N-terminale avec la ninhydrine.
Bull. Soc. Chim. biol., 1970, à paraître in.

51.- NEUZIL (E.), SYLLA (O.), PAUC (Mlle A.) et BRETON (J.C.).- Réaction de la ninhydrine avec quelques alcools α-aminés ; mécanisme de la réaction.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1965, 104, 227-232.

52.- NEUZIL (E.), VIDAL (Mme Y.) et PAUC (Mlle A.).- Réaction photochimique de certains dipeptides à Valine N-terminale avec la ninhydrine.
J. Chromatog., 1970, à paraître in.

53.- O'SULLIVAN (D.).- Vibrational frequency correliations in hetero cyclic moleculs. VI. Special features of a range of compounds possessing a benzene ring fused to a five membered ring.
J. chem. Soc., 1960, 3278-3284.

54.- PAUC (Mlle A.).- Recherches sur la réactivité de la ninhydrine.
Thèse Doct. Pharm. Bordeaux, 1969.

55.- PLAGNOL (H.).- Influence de la structure des composés aminés dans leur réaction avec la ninhydrine.
Thèse Doct. Pharm. Bordeaux, 1962, 1 vol., 156 p., Impr. Drouillard édit. Bordeaux, 1962.

56.- POLONOVSKI (M.), GONNARD (P.) et GLOTZ (G.).- Sur quelques ninhydrylurées, alloxanylurées et sur leur constitution.
Bull. Soc. chim. France, 1939, 5e série, 6, 1557-1576.

57.- PONZIO (G.) et PICHETTO (A.).- Ricerche sulle diossime (V).
Gazz. chim. ital., 1923, 53, 20-24.

58.- PURVIS (J.E.).- The absorption spectra of triketohydrindene hydrate and certain derivatives.
J. chem. Soc., 1911, 99, 1953 - 1960.

59.- RIEMSCHNEIDER (R.), KOKA (R.) et KIESELER (H.).- Umsetzung von Triketohydrinden mit "markierten" α-Aminosäuren unter Ausschlub von H_2O.
Zur Kenntnis der Ninhydrin-Reaktion, 3. Mitt.
Monatsh., 1963, 94, 1131-1132.

60.- RIEMSCHNEIDER (R.) et WEYGANG (C.).- Über die Eignung von 1,2-Diacetylbenzolen zum Nachweis und zur Bestimmung von Aminosäuren.
Monatsh. Chem., 1955, 86, 201-209.

61.- RUHEMANN (S.).- Cyclic di- and tri-ketones.
J. chem. Soc., 1910, 97, 1438-1449.

62.- RUHEMANN (S.).- Triketohydrindene hydrate. Part. III. Its relation to alloxan.
J. chem. Soc., 1911, 99, 792-799.

63.- RUHEMANN (S.).- Triketohydrindene hydrate. Part IV. Hydrindantin and its analogues.
J. chem. Soc., 1911, 99, 1306-1310.

64.- SCHEIBER (J.) et HOPFER (G.).- Ueber die Enolisation β-mono- acylierter α, γ-Indandione. IV. Mitteilung über die Konstitutions bestimmung bei Enolen.
Ber. deut. chem. Ges., 1920, 53B, 697-706.

65.- SCHONBERG (A.) et AWAG (W.I.).- Experiments with diazomethane and its derivatives. Part XV. Action of diazomethane on o-quinone monoximes.
J. chem. Soc., 1950, 72-75.

66.- SCHONBERG (A.) et MOUBASHER (R.).- The Strecker degradation of α-aminoacids.
Chem. Rev., 1952, 50, 261-277.

67.- SIODA (R.E.) et KOSKI (W.S.).- Electron spin resonance spectra of free radical anions of some cyclic anhydrides and imides in dimethylformamide solution.
J. am. chem. Soc., 1967, 89, 475-481.

68.- STEPAN (J.) et KRAL (V.).- Poznámkyk priprave indandionových detekcních cinidel.
Cas. lék. cesk., 1953, 92, 208-210.

69.- STRECKER (A.).- Notiz über eine eigenthümliche Oxydation durch Alloxan.
Ann. Chem., 1862, 123, 363-365.

70.- TEETERS (W.O.) et SHRINER (R.L.).- A new preparation of ninhydrin.
J. am. chem. Soc., 1933, 55, 3026-3028.

71.- TROLL (B.W.) et CANNAN (R.K.).- A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino- and imino-acids.
J. biol. Chem., 1953, 200, 803-811.

72.- WANAG (G.).- 2-Nitroindandion-(1,3) und seine Salze.
Ber. deut. chem. Ges., 1936, 69 B, 1066-1074.

73.- WANAG (G.) et LODE (A.).- Versuche zur Darstellung des Ninhydrins aus 2-Nitro-indandion-(1,3).
Ber. deut. chem. Ges., 1938, 71 B, 1267-1272.

74.- WISLICENUS (W.).- Ueber die Vereinigung verschiedener Ester durch Natrium.
Ber. deut. chem. Ges., 1887, 20, 589-595.

75.- WISLICENUS (W.).- Einwirkung von Essigester auf Phtalsäureester.
Ann. Chem., 1888, 246, 347-355.

*

*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE - Rappels sur la ninhydrine 3

I.- Synthèse de la ninhydrine 4

II.- Propriétés physiques 5

III.- Propriétés chimiques 7

- Réaction de la ninhydrine avec les composés aminés 7

a - Généralités 7

b - Mécanisme de Neuzil et al. 9

c - Cas des acides aminés 10

d - Réactions atypiques 12

e - Formation des autres produits 15

DEUXIEME PARTIE - Contribution personnelle 18

Chapître I.- 19

I.- Exposé du problème étudié 19

II.- Conditions opératoires standards 21

Chapître II.- Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine 24

I.- Influence du temps d'irradiation 24

II.- Influence de la concentration en phényl-1-amino-2-propane et en ninhydrine 27

III.- Rendement en pourpre de Ruhemann 28

IV.- Influence du temps de contact et de la température d'incubation à l'obscurité 29

V.- Influence de la nature et de la concentration en alcool 31

VI.- Influence de la concentration en sels 35

1 - Influence de la concentration en phosphates .. 35

2 - Influence du pH du tampon phosphate 36

3 - Spécificité des phosphates : influence de divers anions 38

4 - Influence des phosphates sur la formation de pourpre de Ruhemann à partir d'autres composés aminés 42

VII.- Spécificité d'action de la ninhydrine 45

Chapître III.- Réaction photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ avec la ninhydrine 47

I.- Amines aliphatiques 48

1- Influence de la longueur de la chaîne carbonée.. 50

2- Influence de l'emplacement du groupement $-NH_2$ sur la chaîne carbonée 51

3- Influence de la structure du groupement substituant 52

II.- Amines cyclaniques 53

III.- Amines aromatiques 54

1- Influence du noyau benzénique 57

2- Modifications dans la chaîne latérale 57

3- Substitution du noyau aromatique 59

IV.- Amines $(R,R')CH-NH_2$ "spontanément" réactives 59

Chapître IV.- Identification photochimique des amines $(R,R')CH-NH_2$ en chromatographie de partage 69

I.- La réaction photochimique en chromatographie sur papier 69

II.- Recherche d'un protocole général 70

III.- La réaction photochimique sur d'autres supports chromatographiques 71

IV.- Comportement de différentes amines dans la réaction photochimique en chromatographie sur papier 73

Chapître V.- Interprétation des résultats 78

I.- Nature des produits de dégradation 78

II.- Remarques sur les modalités d'irradiation 81

III.- Mise en évidence d'un composé intermédiaire 84

1- Etude spectrophotométrique du milieu soumis à l'incubation à l'obscurité 84

2- Etude chromatographique 87

IV.- Mécanisme de la réaction photochimique 88

CONCLUSIONS 93

BIBLIOGRAPHIE 96

TABLE DES MATIERES 104

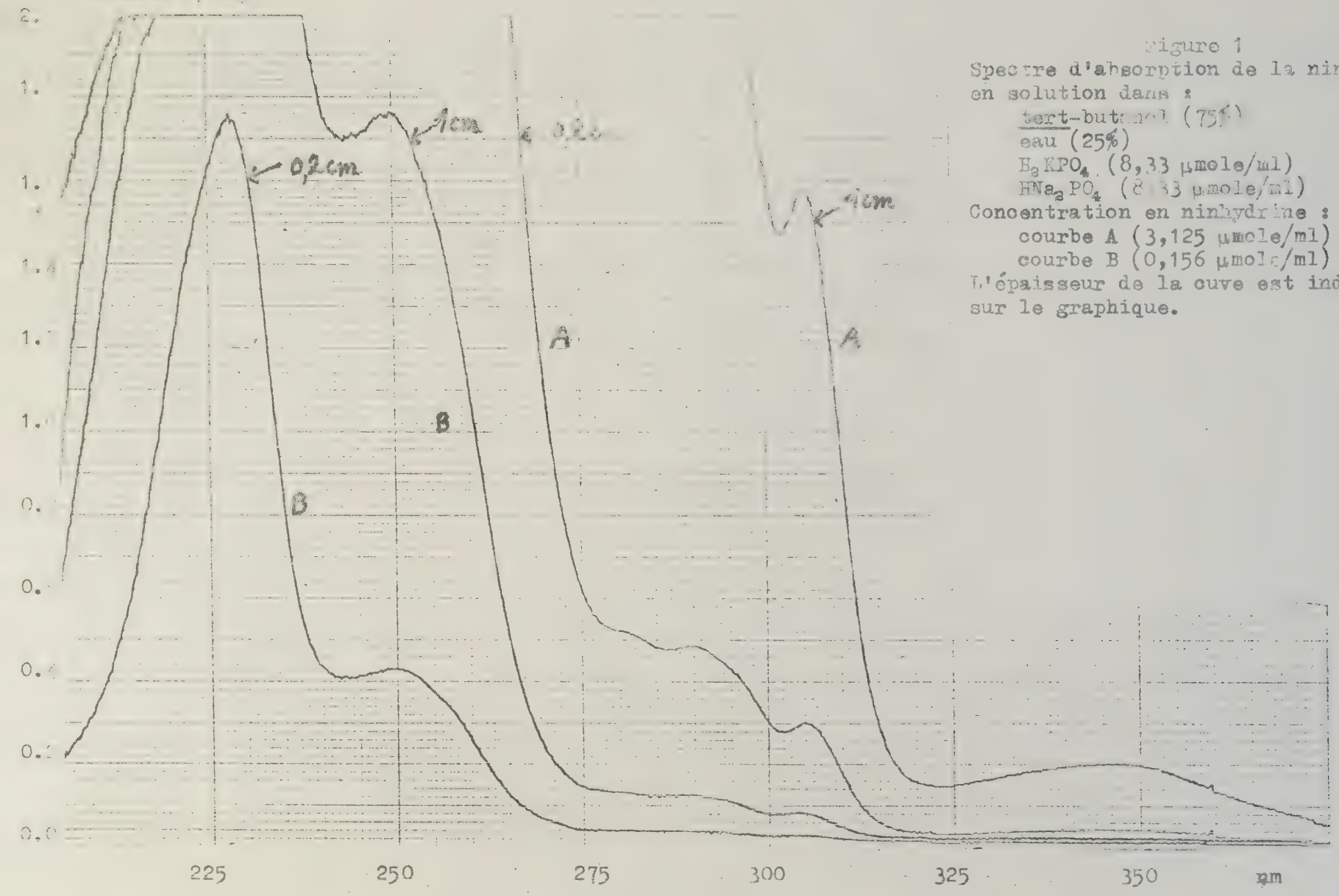


Figure 1

Spectre d'absorption de la ninhydrine en solution dans :

tert-butanol (75%)
eau (25%)
H_2KPO_4 (8,33 µmole/ml)
HNa_2PO_4 (8,33 µmole/ml)

Concentration en ninhydrine :

courbe A (3,125 µmole/ml)
courbe B (0,156 µmole/ml)

L'épaisseur de la cuve est indiquée sur le graphique.

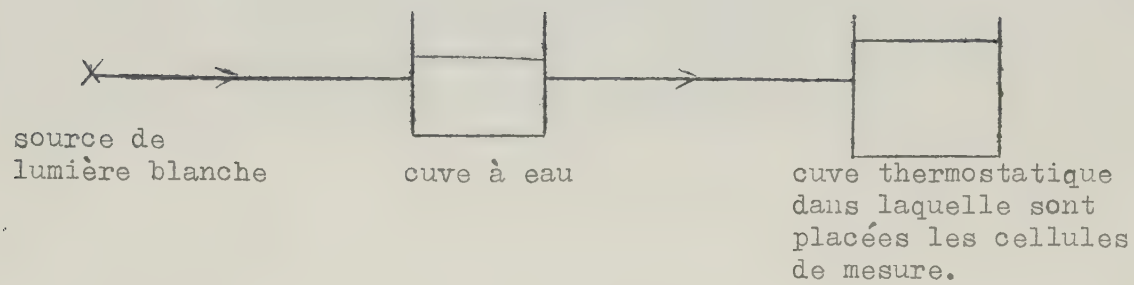


Figure 2
Schéma de l'appareil.

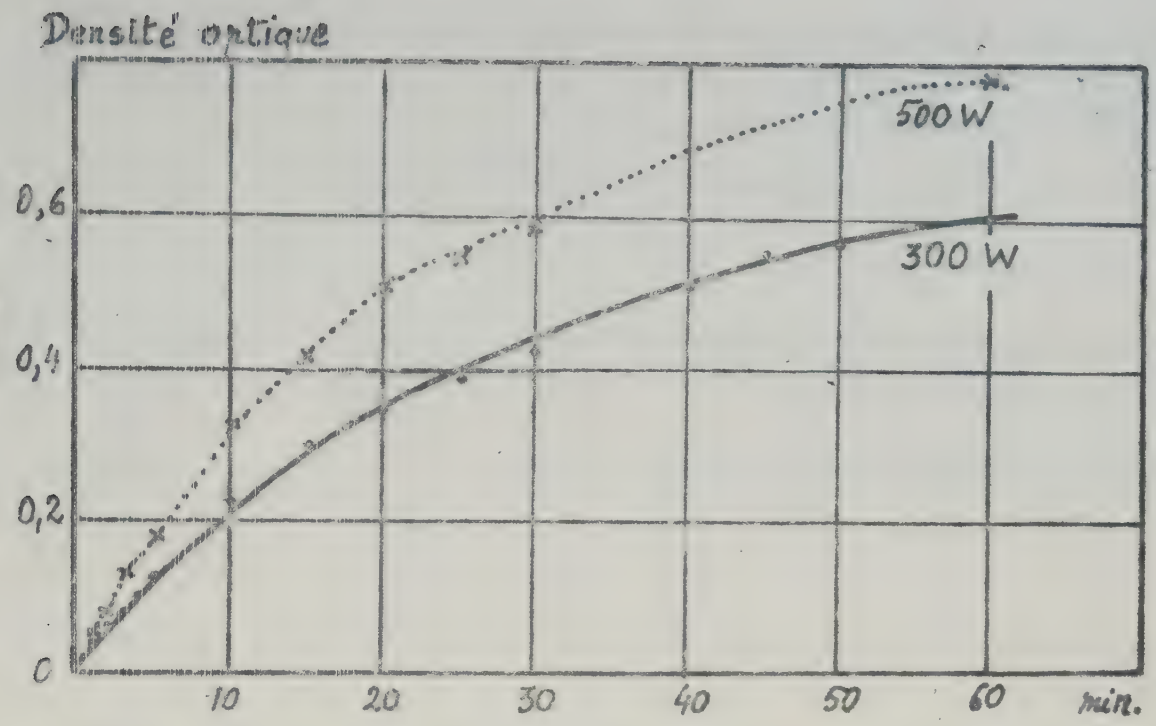


Figure 3
Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane, avec la ninhydrine.
Influence de la durée d'irradiation.
24h. d'incubation à l'obscurité, irradiation avec une lampe de 500 W ou de 300 W.

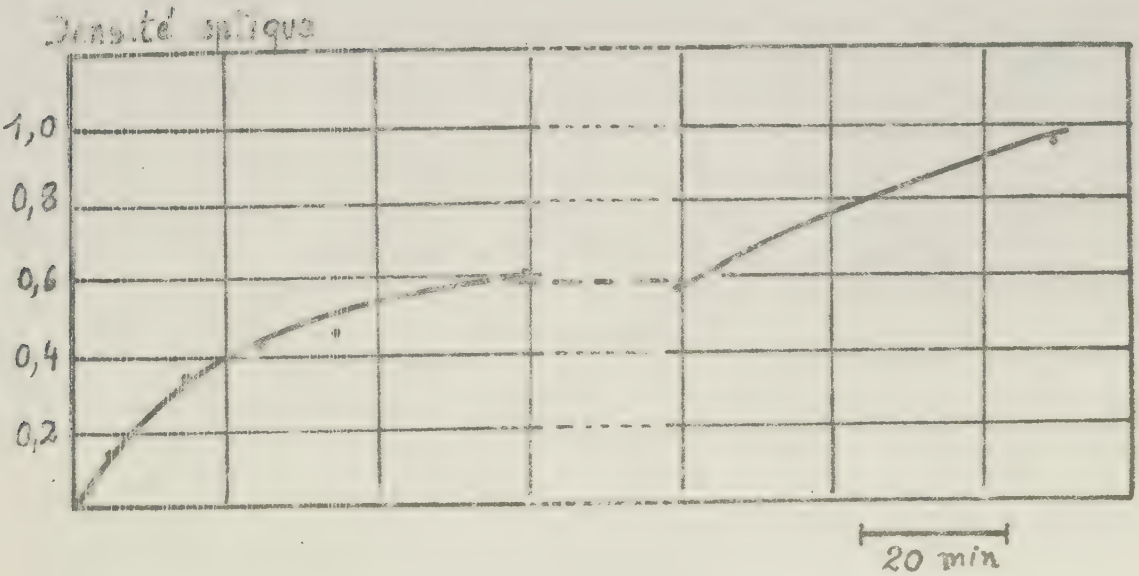


Figure 4
Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.
Effet d'une irradiation continue ou discontinue.

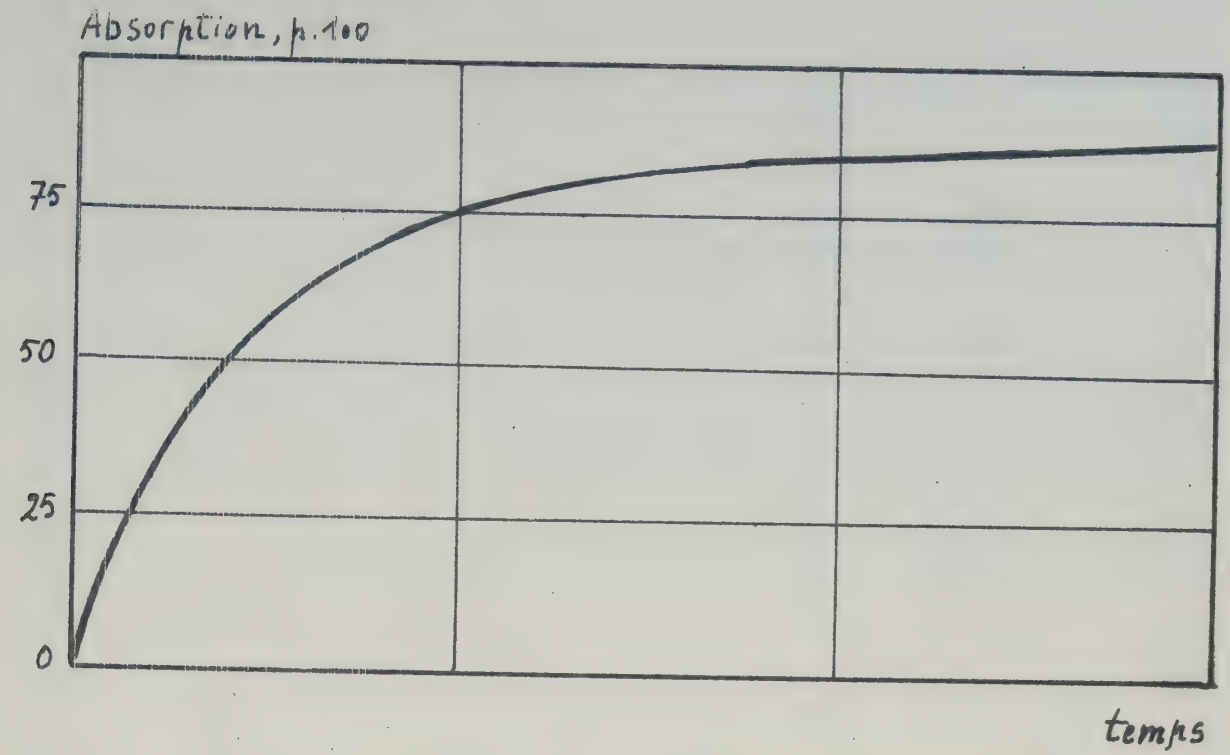


Figure 6
Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane
avec la ninhydrine.

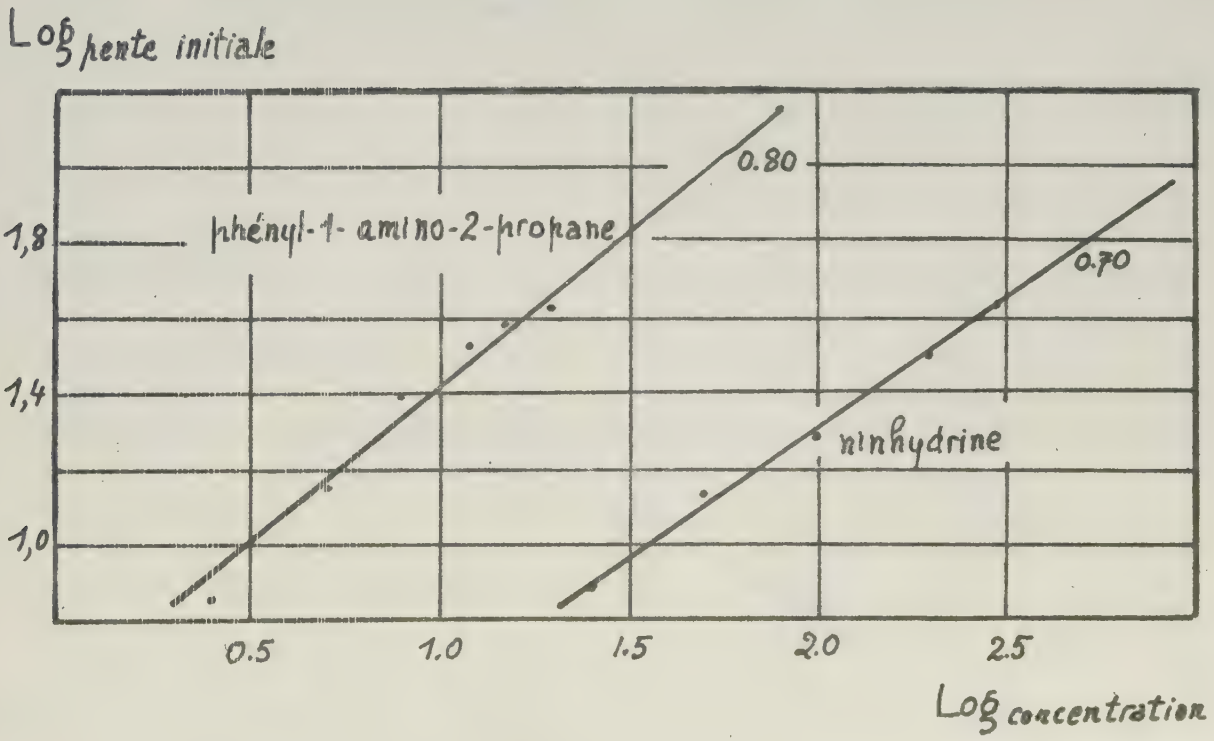


Figure 7
Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane
avec la ninhydrine.
Détermination de l'ordre de la réaction par rapport
au phényl-1-amino-2-propane et à la ninhydrine.

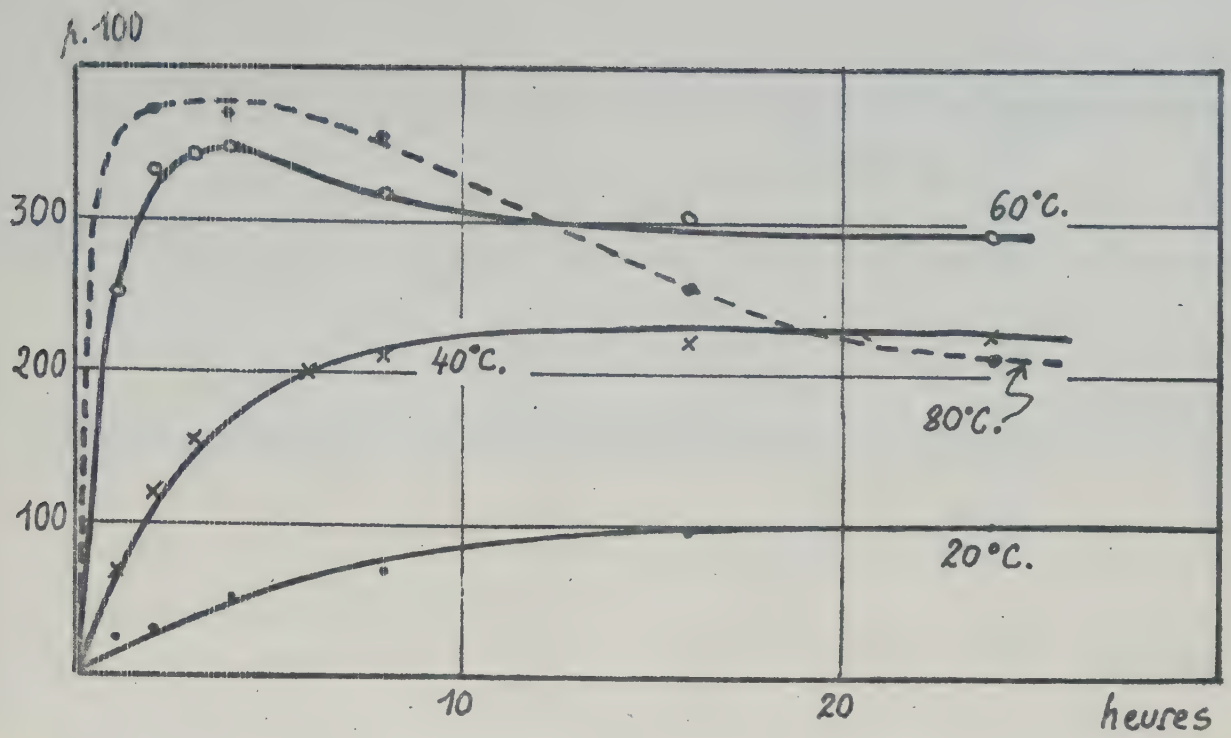


Figure 8
Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.
Influence de la durée d'incubation à l'obscurité.
Influence de la température pendant l'incubation.

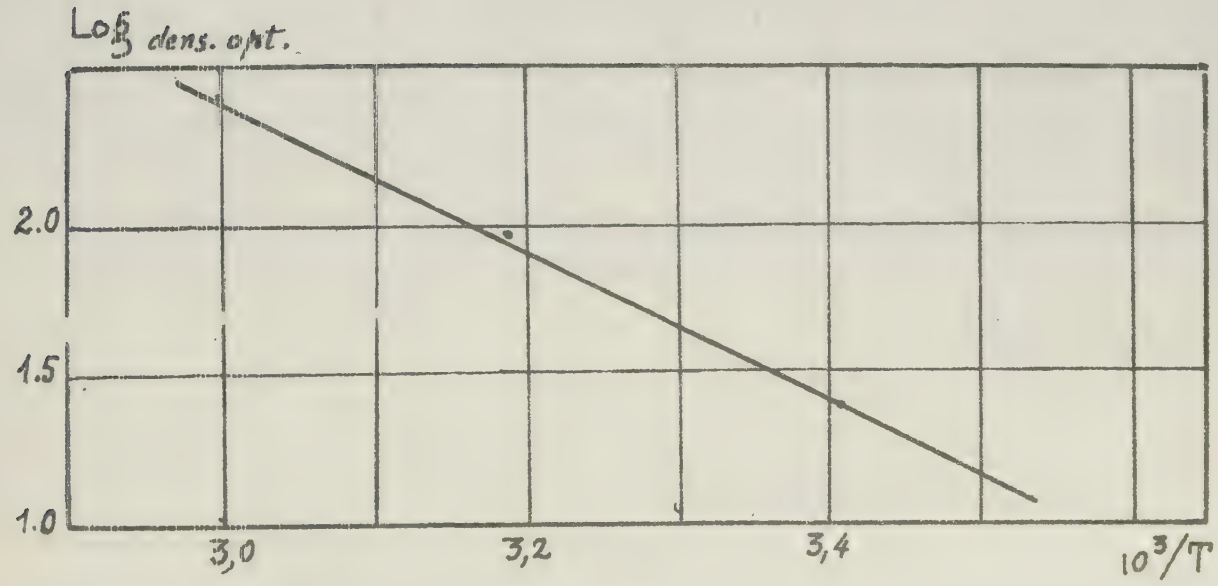


Figure 9

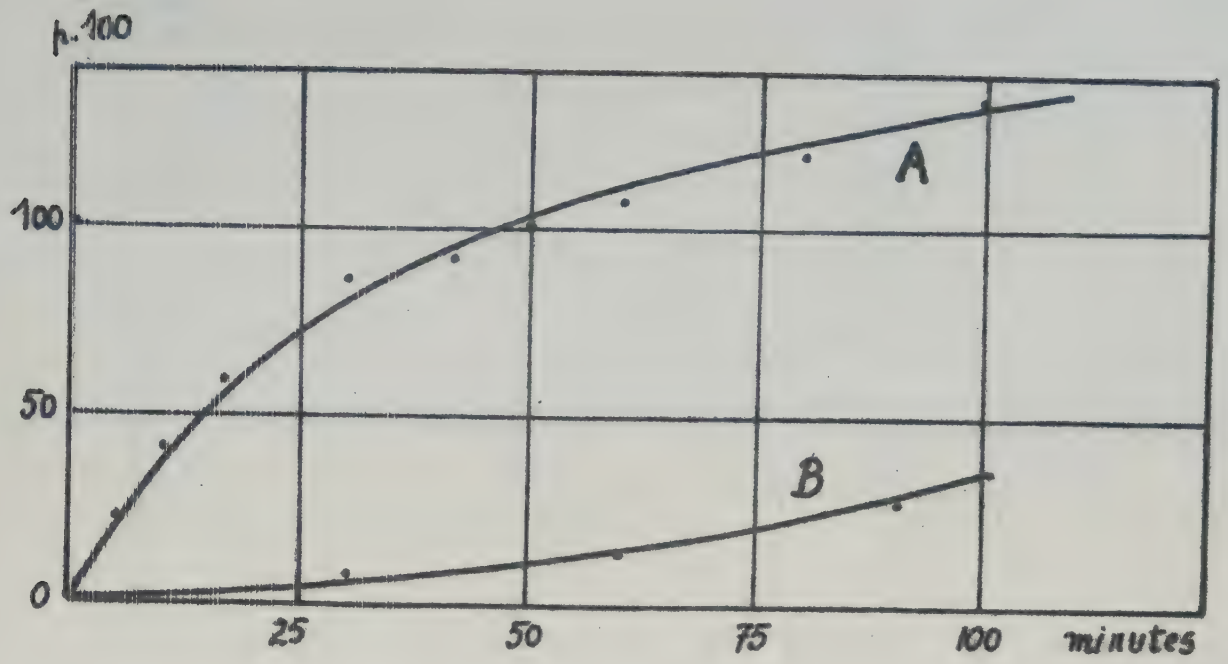


Figure 10
A : étalon interne, B : mélange incubé sans tert-butanol, celui-ci étant ajouté avant l'irradiation.

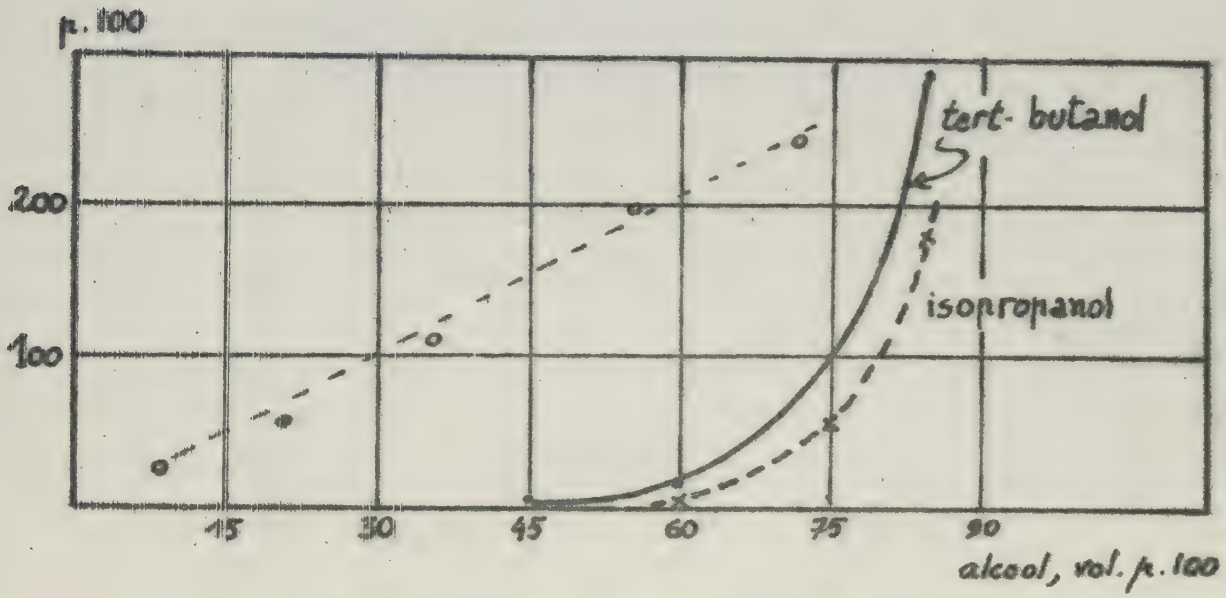


Figure 11
Réaction photochimique du phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.
Concentrations habituelles en composé aminé, en phosphates et en ninhydrine.
Influence de la concentration en tert-butanol et en isopropanol.
Incubation de 24h à 21°C ; irradiation de 50 mn (lampe de 300 W).
En pointillés : logd = f(c).

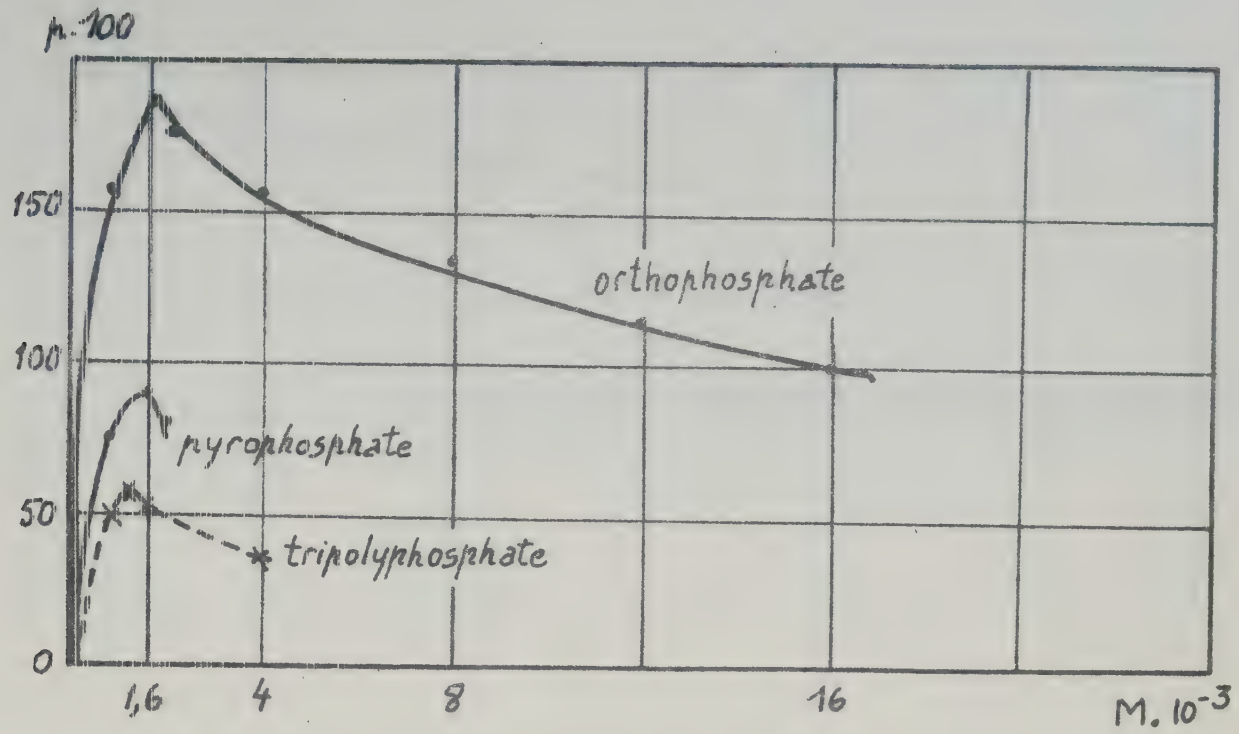


Figure 12
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane, avec la ninhydrine.
Influence de la concentration en orthophosphate, pyrophosphate et tripolyphosphate.
Incubation de 24h à l'obscurité (21°C)
Irradiation de 30 min (lampe de 500 W).

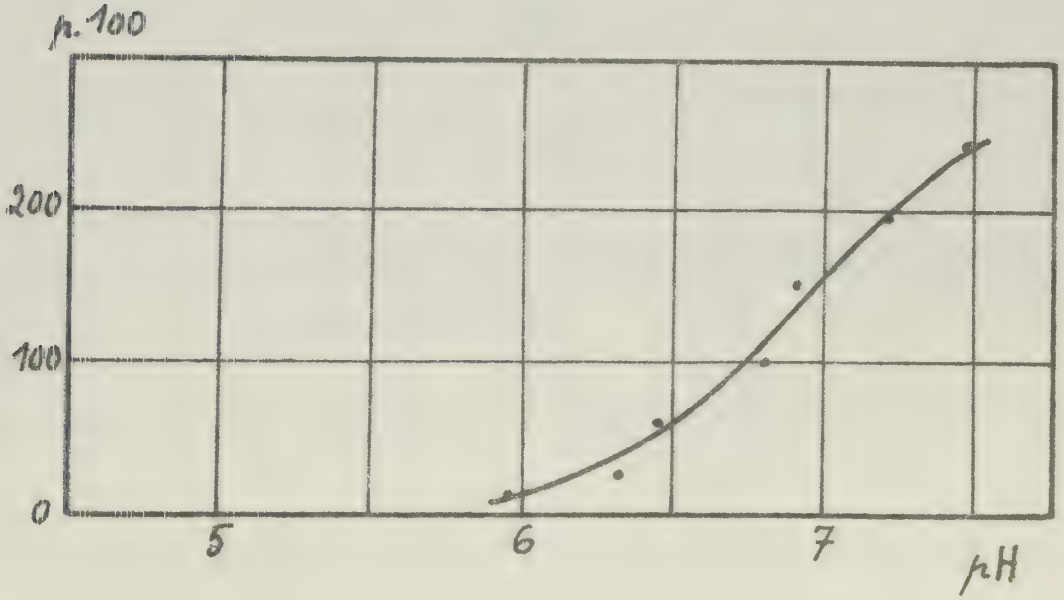


Figure 13
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane, avec la ninhydrine.
Influence du pH du tampon phosphate.

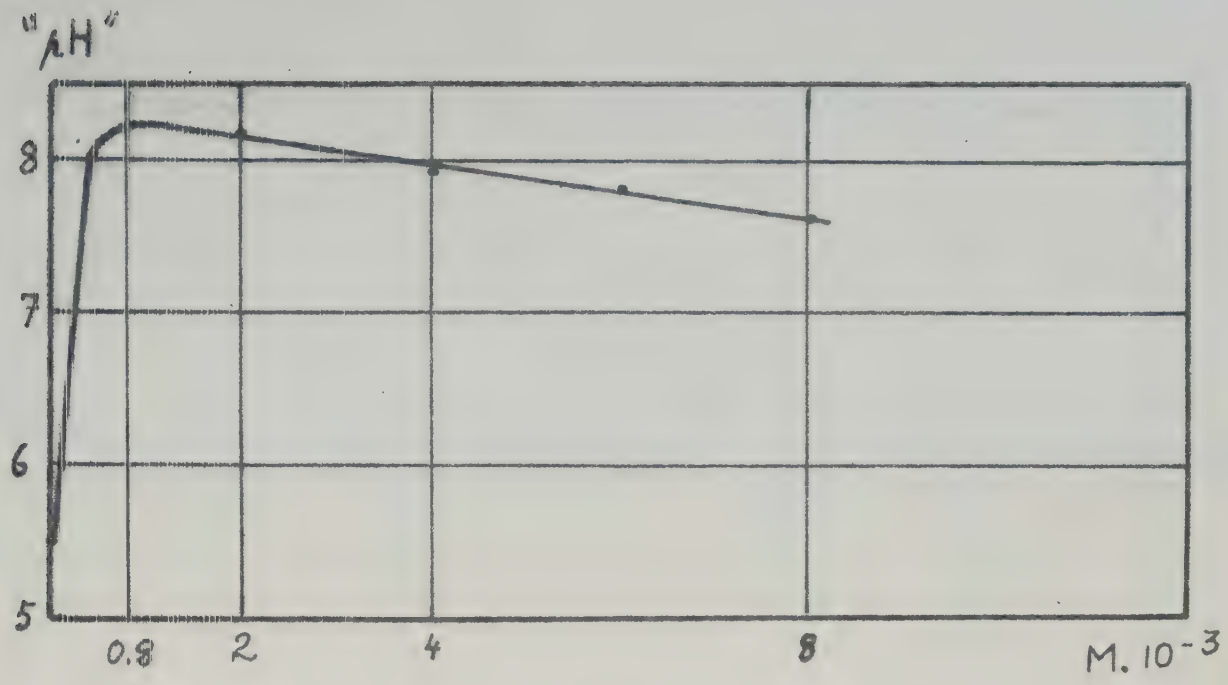


Figure 14
Variation du "pH" du milieu réactionnel en fonction de la concentration finale du tampon phosphate équimoléculaire en PO_4HNa_2 et PO_4H_2K.

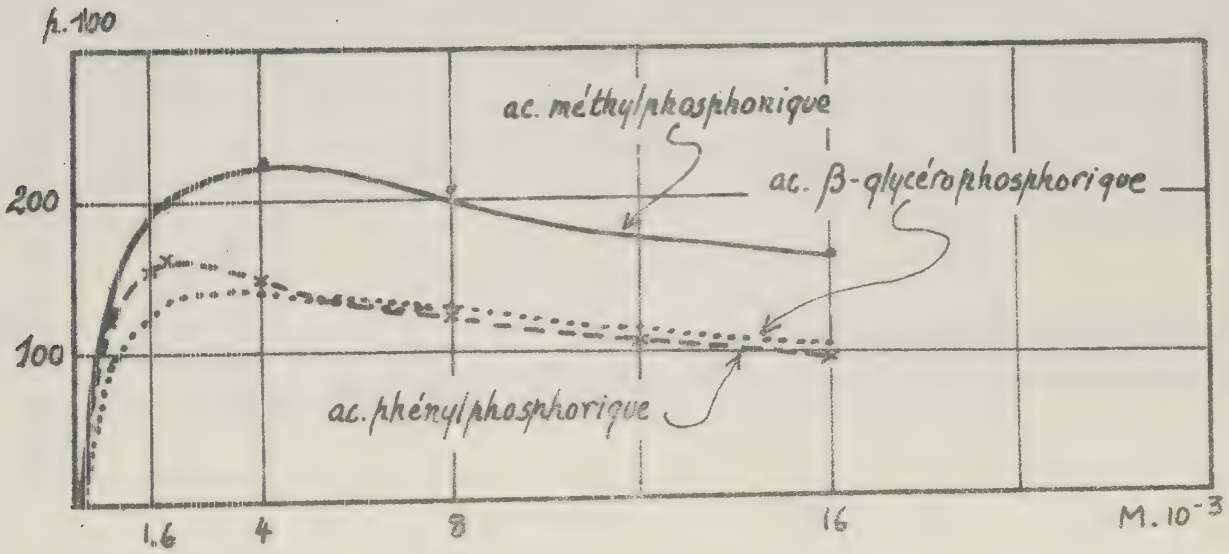


Figure 15
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la ninhydrine.
Influence de la concentration en : ac. β-glycérophosphorique, ac. phényl-phosphorique et ac. méthylphosphonique.
Conditions expérimentales de la figure 12.

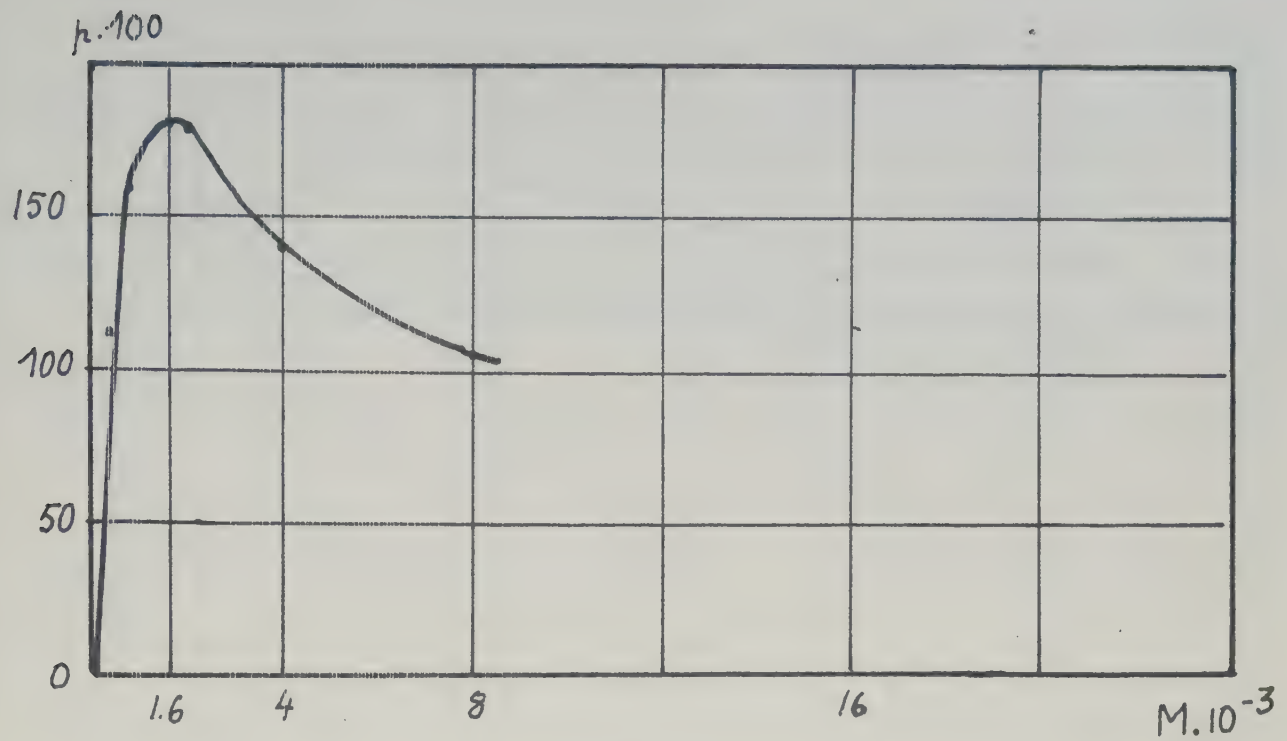


Figure 16
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane, avec la ninhydrine
Influence de la concentration en arséniate
Conditions expérimentales de la figure 12.

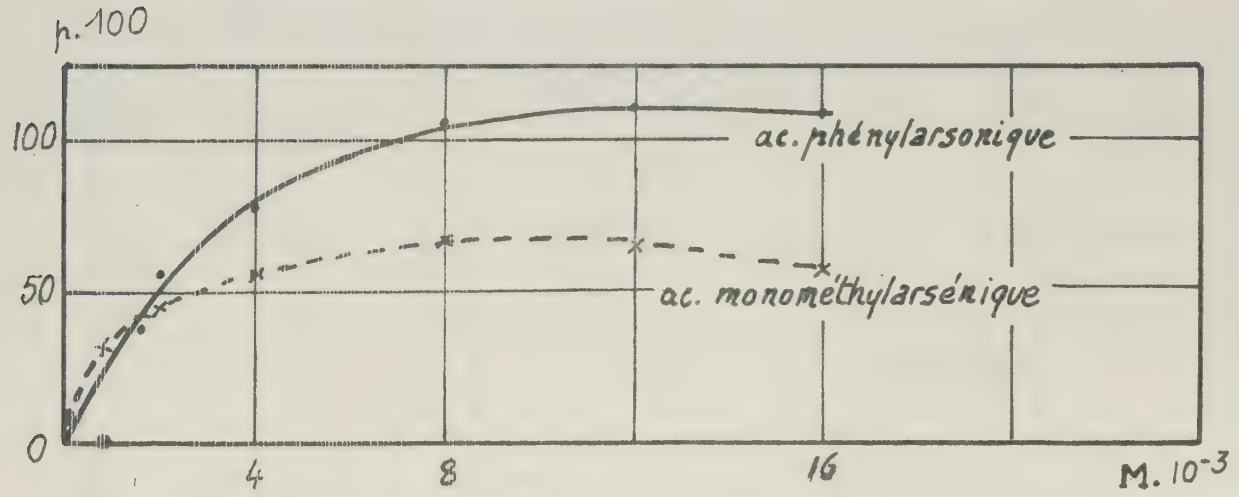


Figure 17
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane, avec la ninhydrine
Influence de la concentration en ac. phénylarsénique et ac. monométhylarsénique.
Conditions expérimentales de la figure 12.

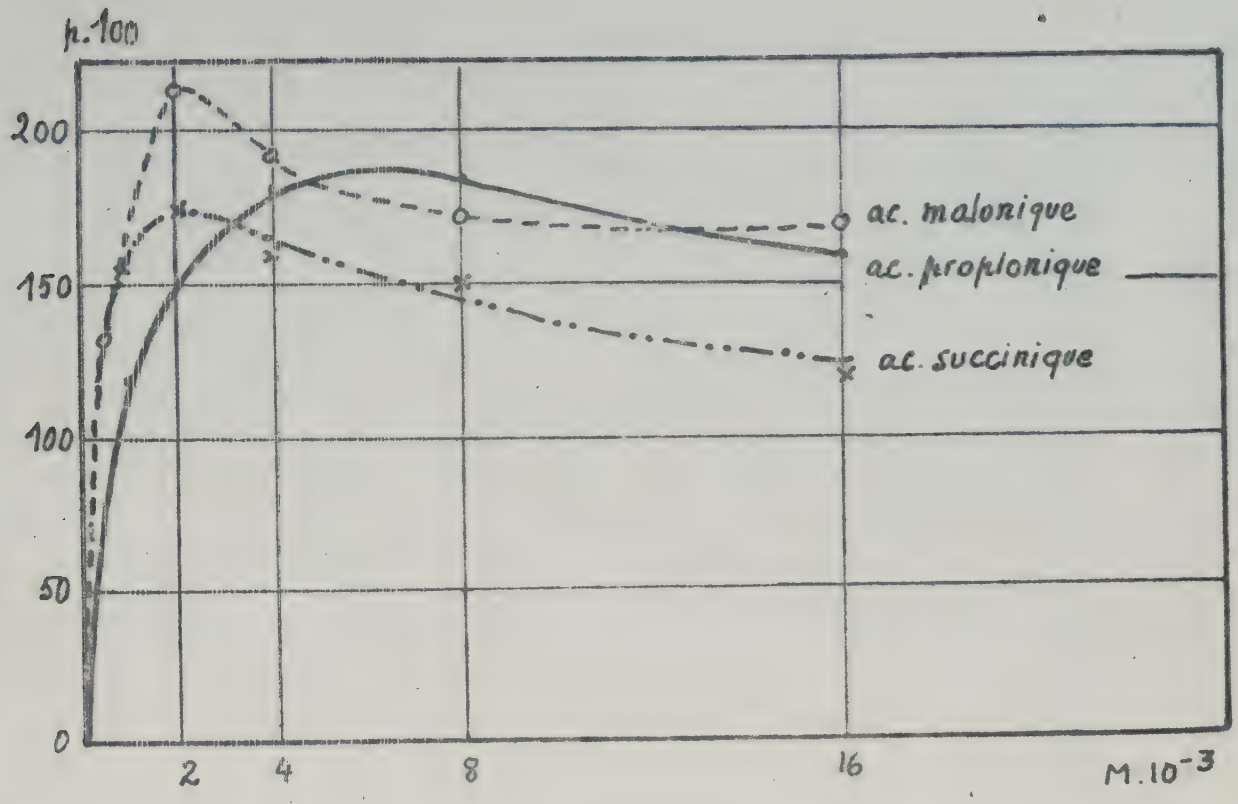


Figure 18
Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane, avec la ninhydrine.
Influence de la concentration en acides malonique, succinique et propionique.
Conditions expérimentales de la figure 12.

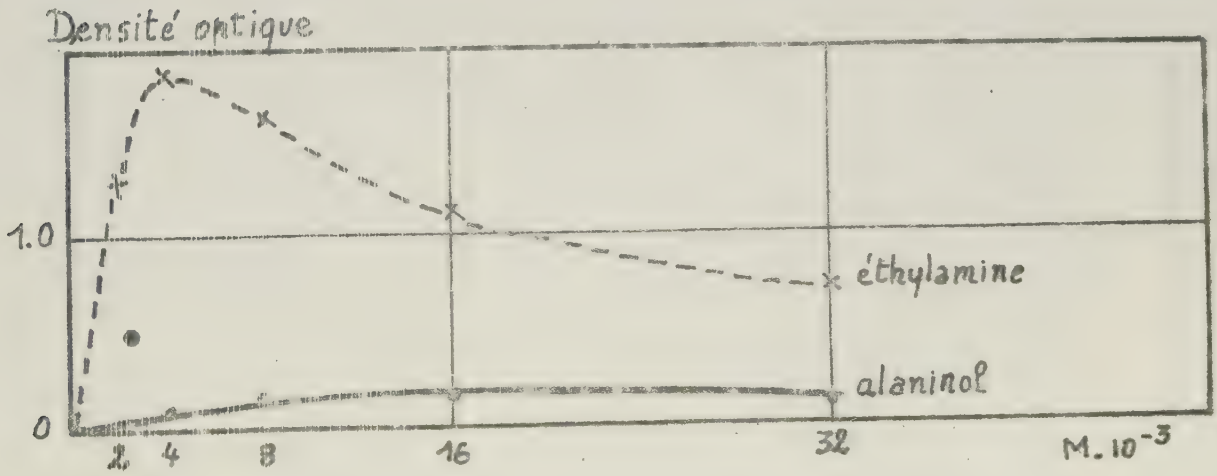


Figure 19
Réaction de l'éthylamine et de l'alaninol avec la ninhydrine en présence de 75 p. 100 de tert-butanol.
Influence de la concentration en phosphate.

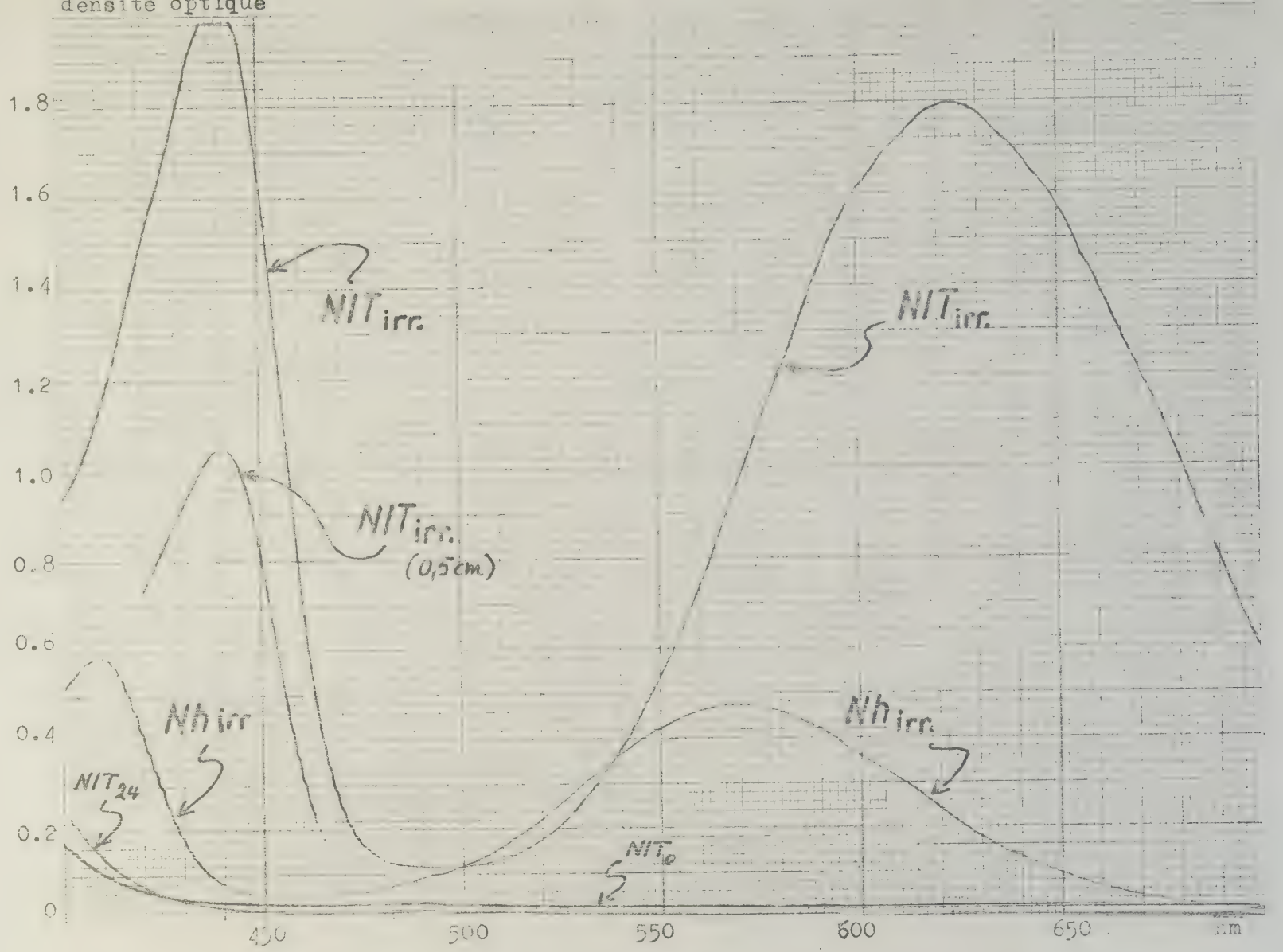


Figure 20

Réaction photochimique du sulfate de phényl-1-amino-2-propane avec la benzo-5,6-indanetrione-1,2,3 (NIT).

Avant irradiation : NIT_0 : mélange non [illegible] NIT_{24} : après 24h à l'obscurité.

Après irradiation : NITirr., [illegible] (Nh irr) — Cuve de 1cm.

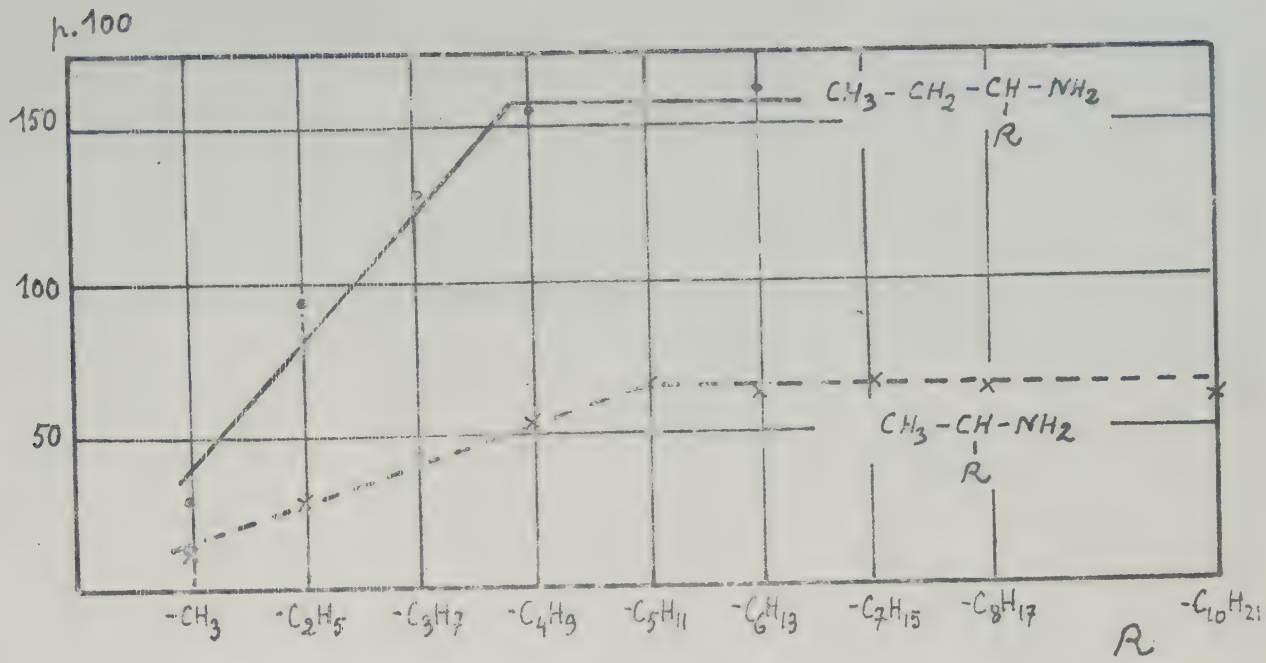
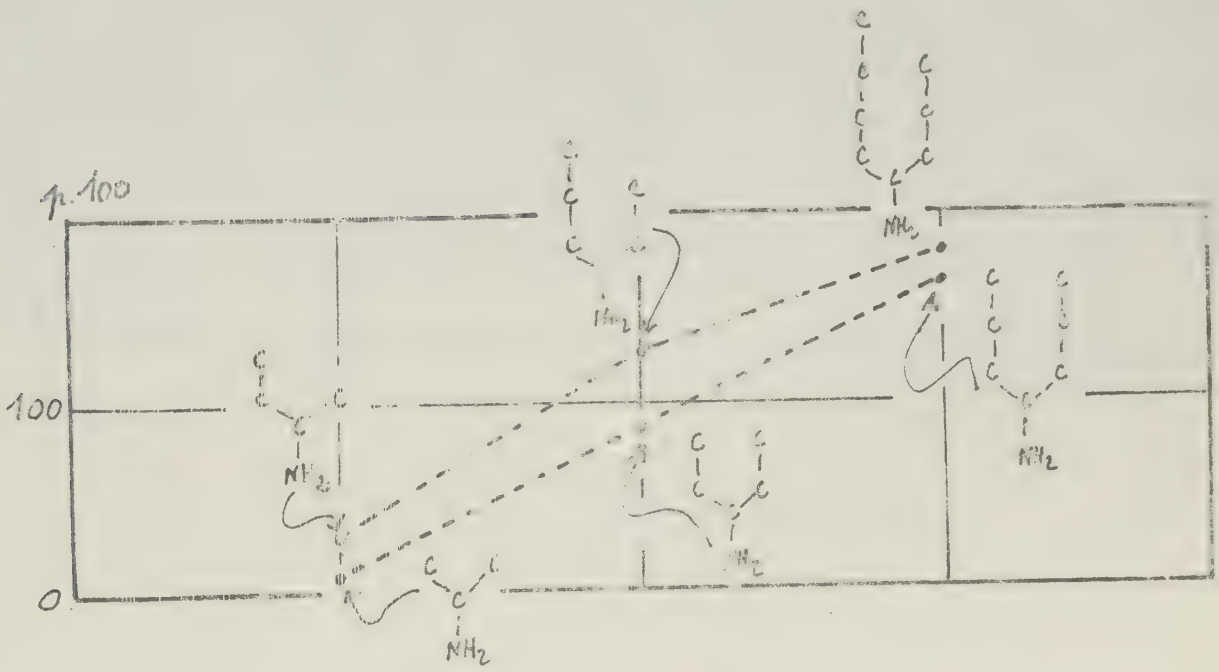


Figure 2:
Réaction photochimique des amines aliphatiques
avec la ninhydrine.



Réaction photochimique d'amines aliphatiques
avec la ninhydrine.
Influence de la longueur de la chaîne (seul le squelette carboné de la molécule a été représenté

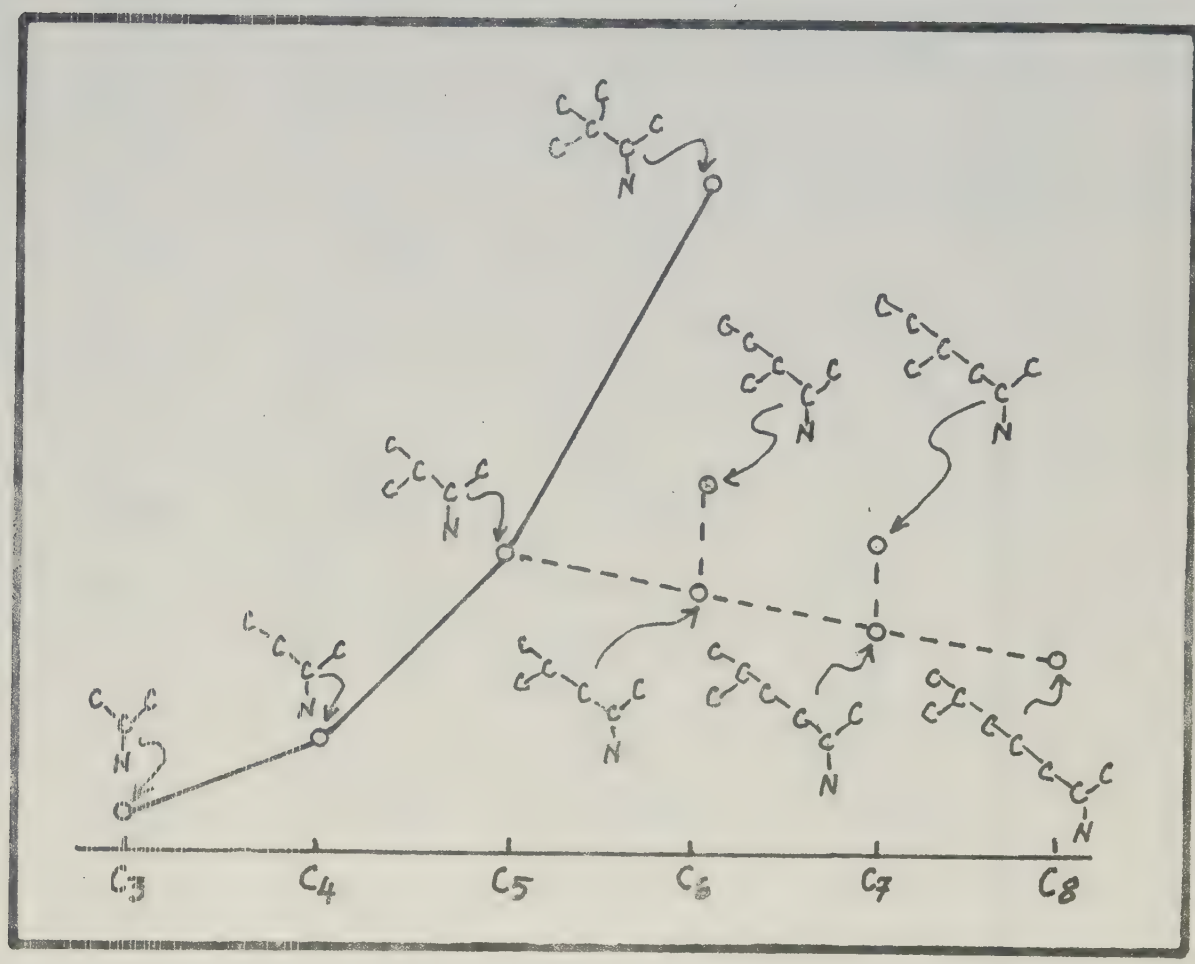


Figure 23
Réaction photochimique des amines aliphatiques
avec la ninhydrine.
Influence de la structure du groupement substituant.

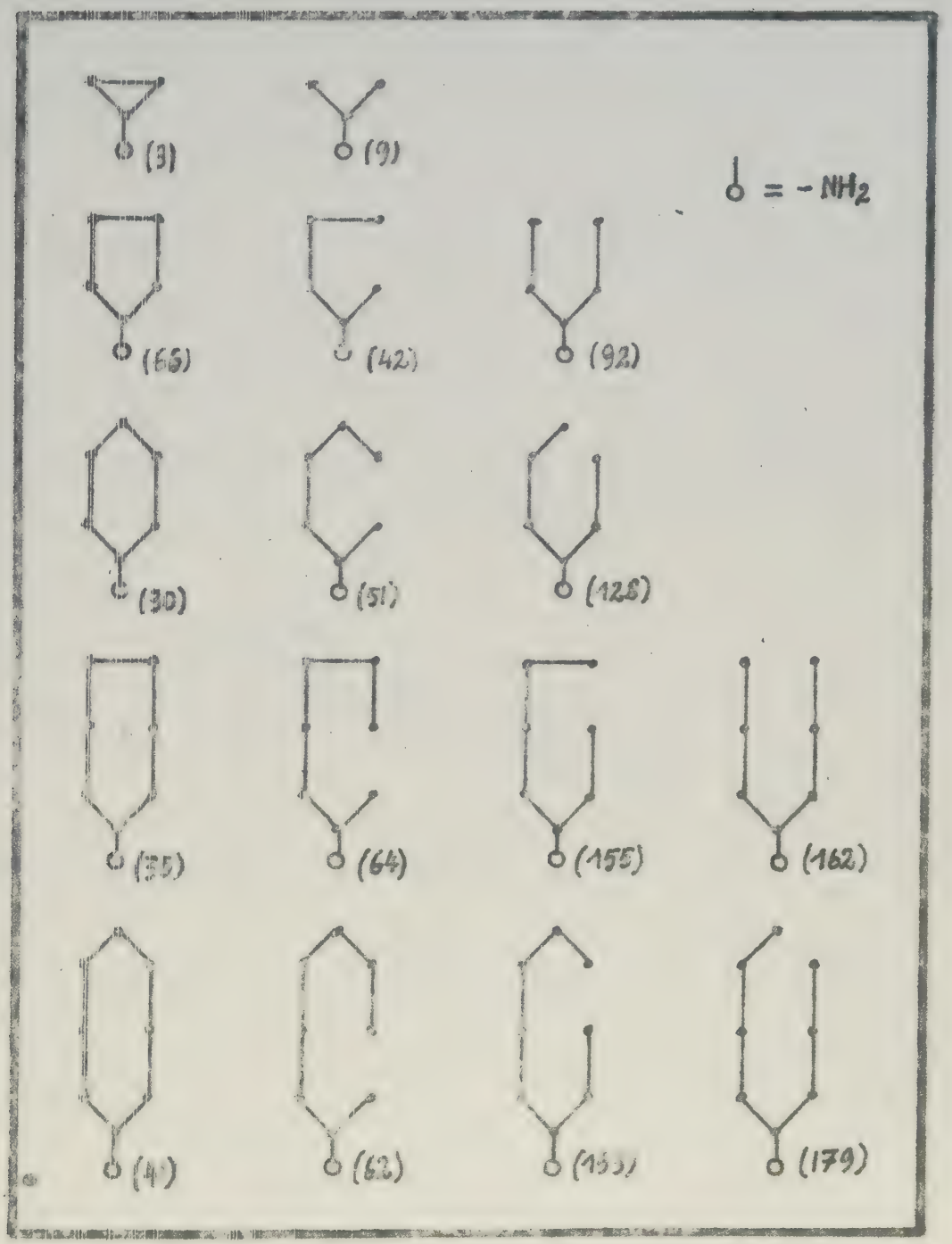


Figure 24
Réaction photochimique des amines cyclaniques avec la ninhydrine. Comparaison entre la structure cyclanique et la structure ouverte correspondante.

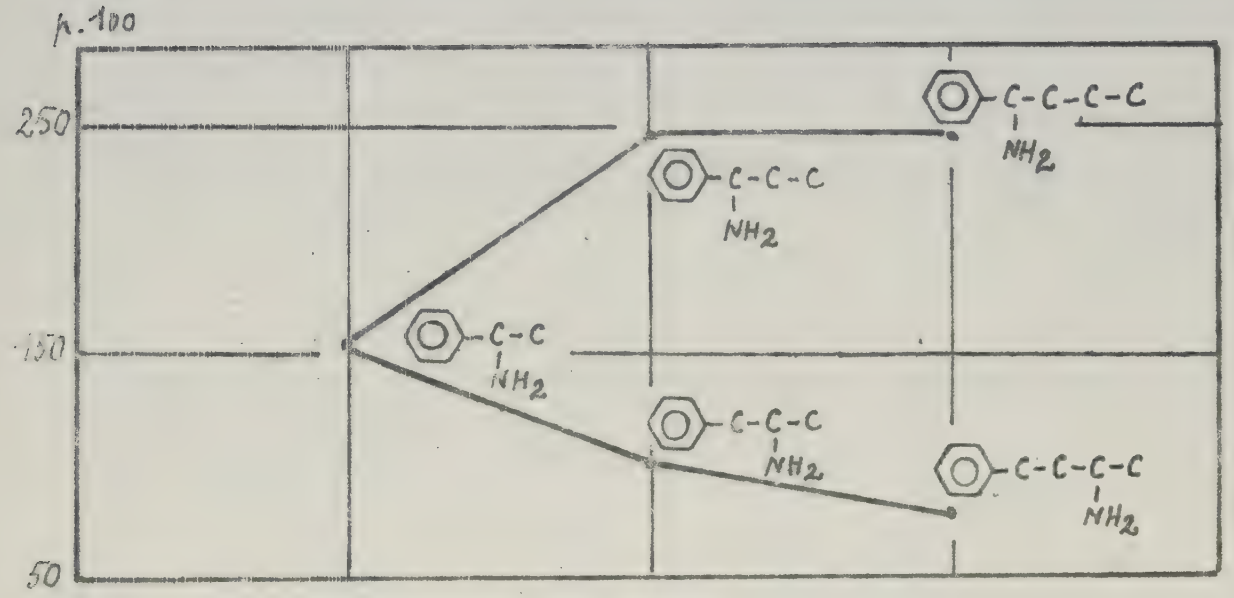


Figure 25
Réaction photochimique des amines aromatiques
avec la ninhydrine.

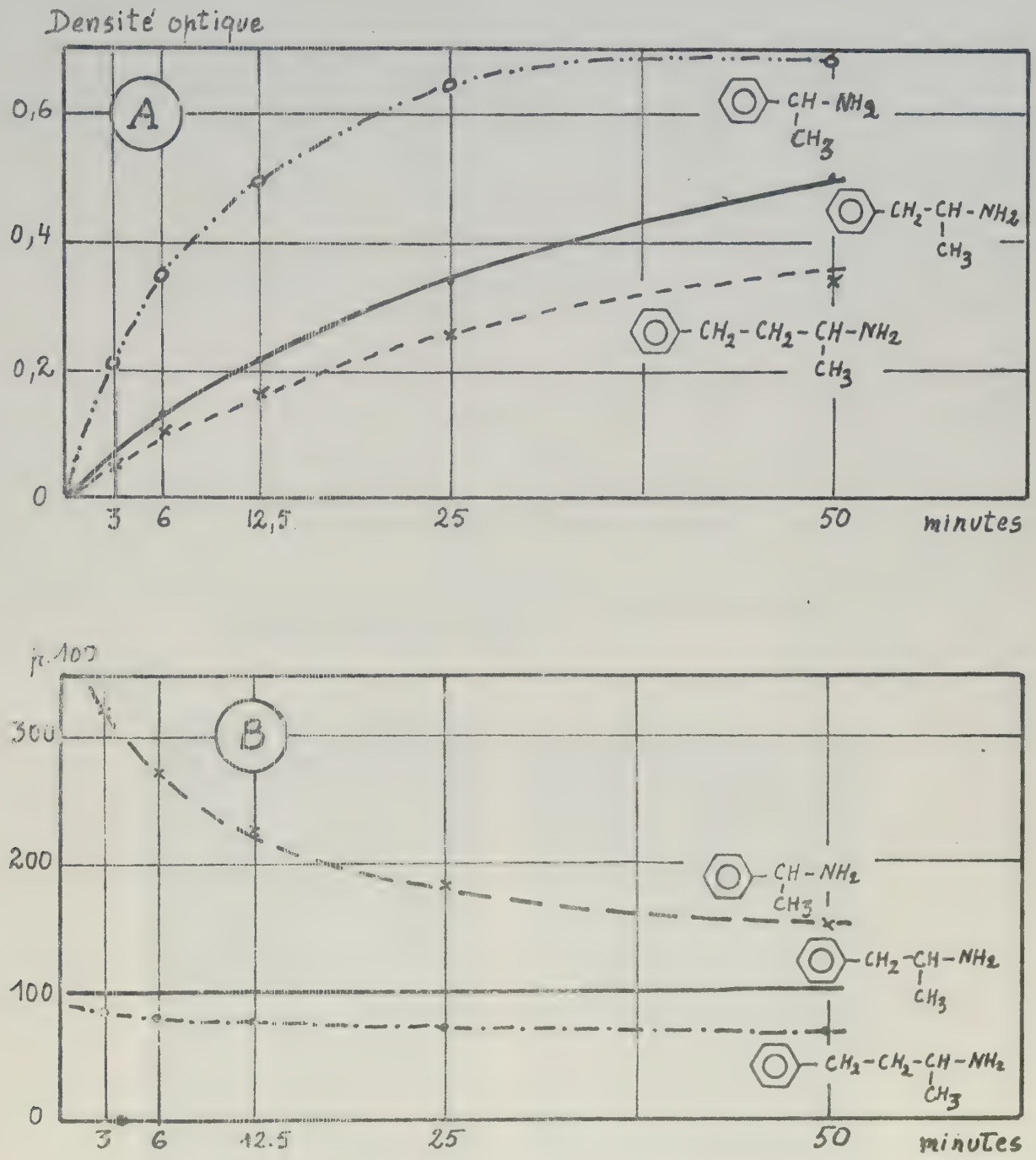


Figure 26

Réaction photochimique de la ninhydrine avec l'α-méthyl-benzylamine, l'amphétamine et l'amino-3-phényl-1-butane.

A - Variation de la densité optique au cours de l'irradiation

B - Variation du rapport R (voir texte).

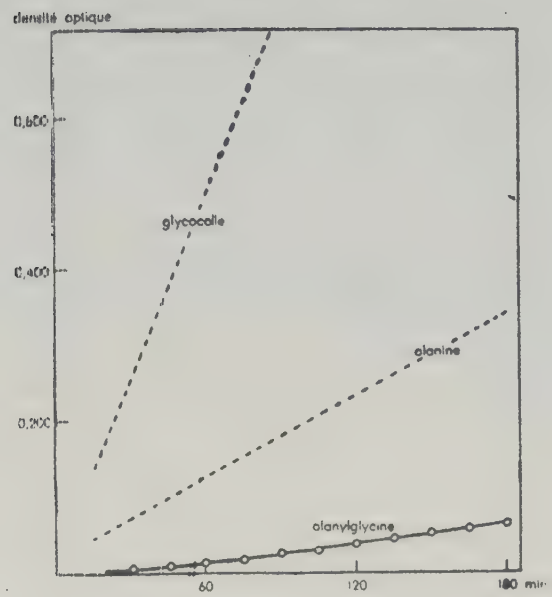


Figure 27
Cinétique de la réaction ninhydrine-peptides
Cas des alanylpeptides.

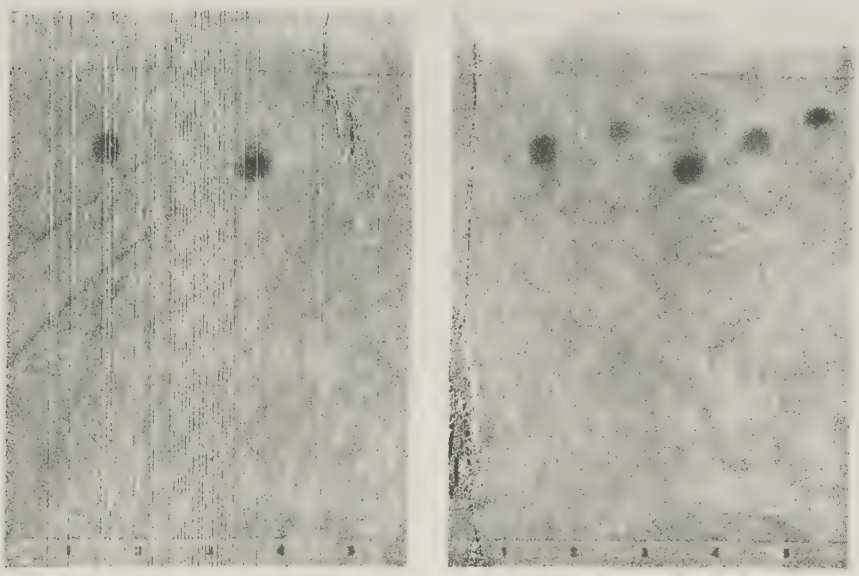


Figure 28
Influence de la lumière sur la réaction des amines $(R,R')CH-NH_2$ (voir texte) avec la ninhydrine.
A gauche : avant exposition à la lumière,
A droite : après 5 minutes d'exposition à la lumière.

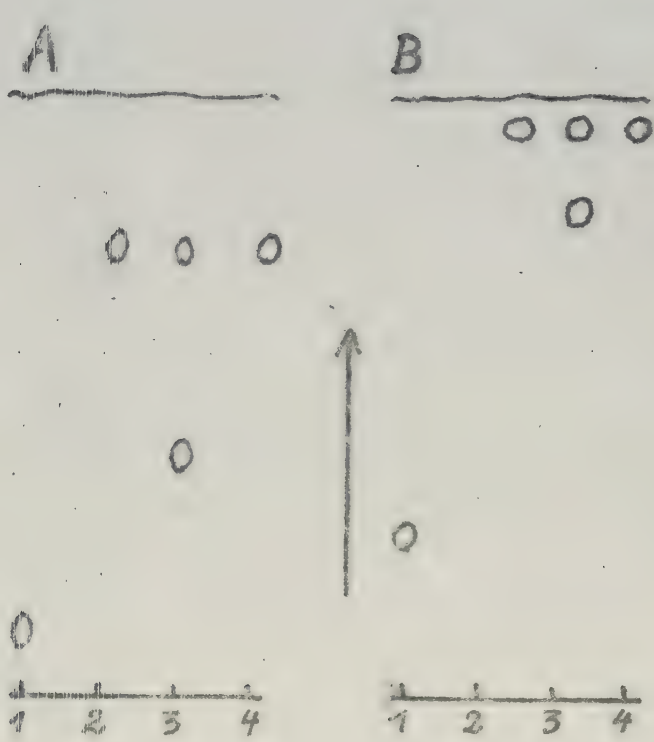


Figure 29

Chromatographie sur couche mince :

1 : dinitro-2,4-phénylhydrazine.

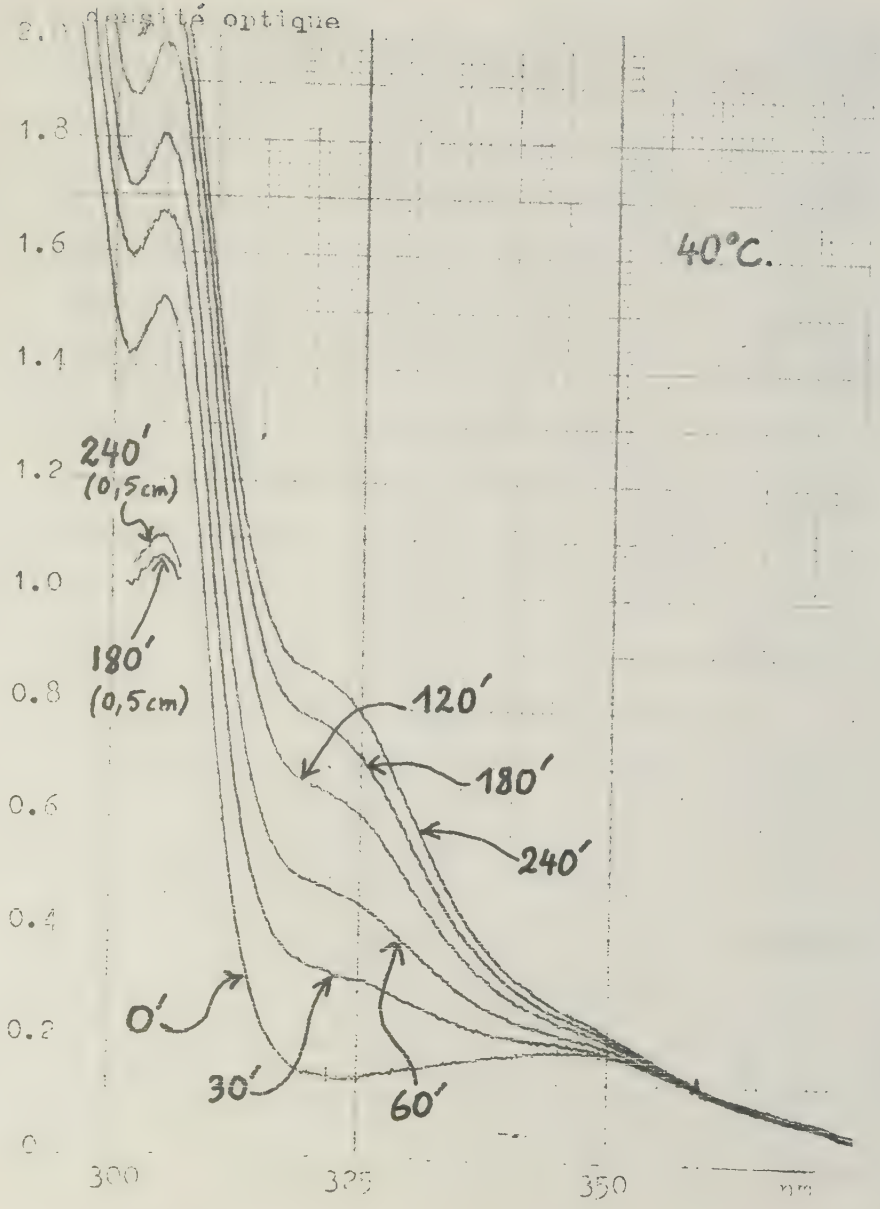
2 : dinitro-2,4-phénylhydrazone de la phényl-acétone.

3 : dinitro-2,4-phénylhydrazone formée au cours de l'expérience en milieu aqueux.

4 : dinitro-2,4-phénylhydrazone formée au cours de l'expérience en présence de phosphates.

Phase solvante : A - benzène, acétate d'éthyle (95 : 5).

B - toluène, acétate d'éthyle (3 : 1).



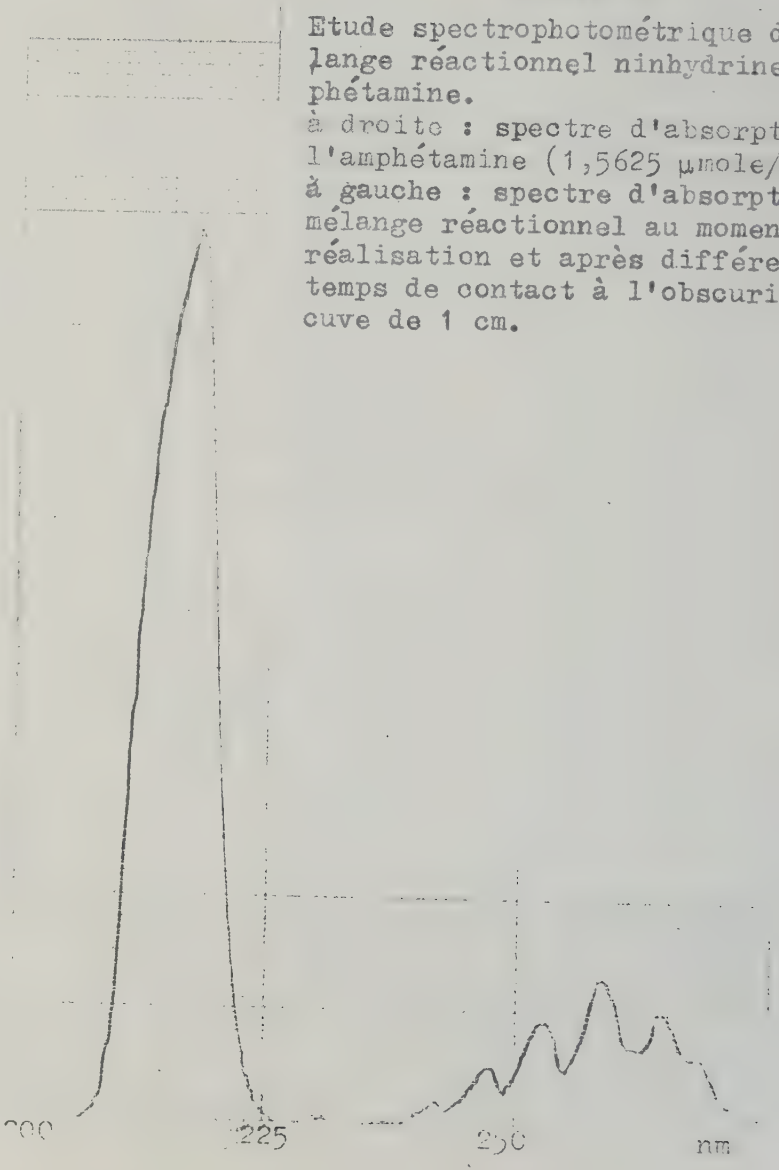


Figure 30

Etude spectrophotométrique du mélange réactionnel ninhydrine-amphétamine.
à droite : spectre d'absorption de l'amphétamine (1,5625 µmole/ml).
à gauche : spectre d'absorption du mélange réactionnel au moment de sa réalisation et après différents temps de contact à l'obscurité.
cuve de 1 cm.

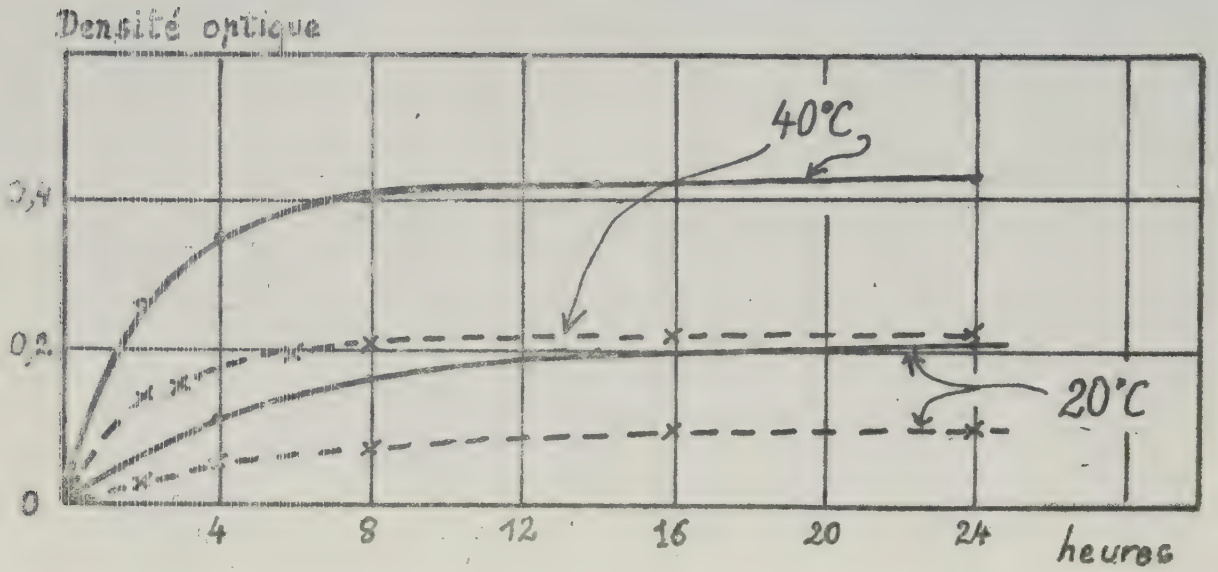


Figure 31
Variations de la densité optique à λ=322 nm du mélange réactionnel ninhydrine-amphétamine en fonction du temps d'incubation à l'obscurité et de la température.
En pointillés sont rappelés les tracés de la figure 8 (voir texte).

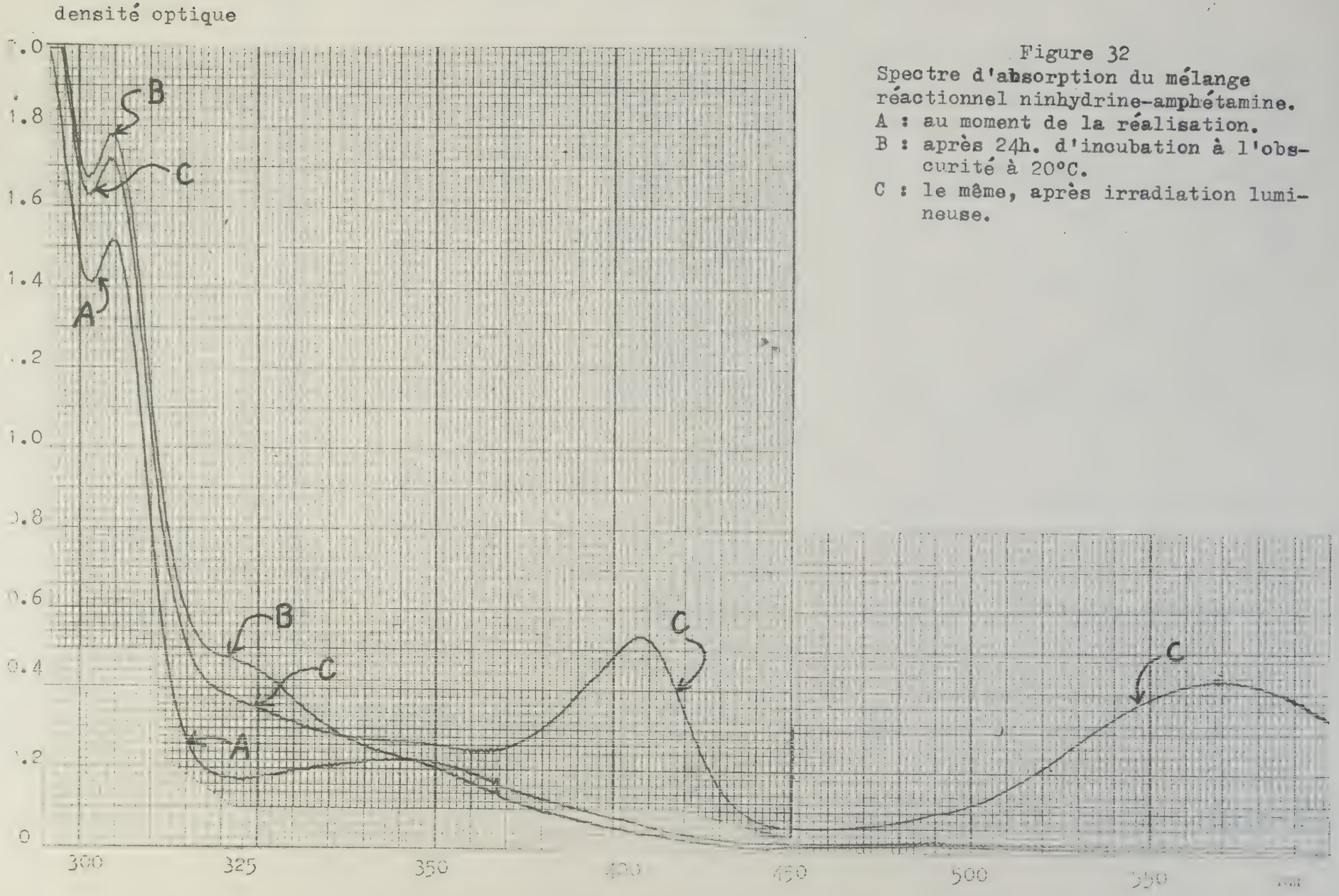


Figure 32
Spectre d'absorption du mélange réactionnel ninhydrine-amphétamine.
A : au moment de la réalisation.
B : après 24h. d'incubation à l'obscurité à 20°C.
C : le même, après irradiation lumineuse.

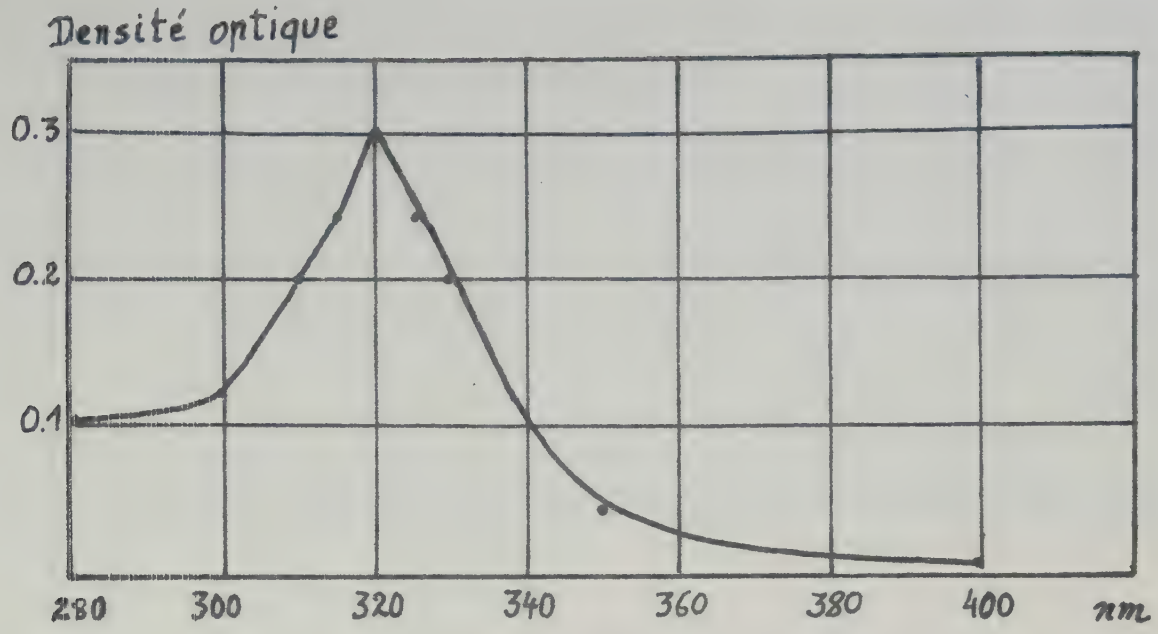


Figure 33
Spectre d'action du composé intermédiaire.

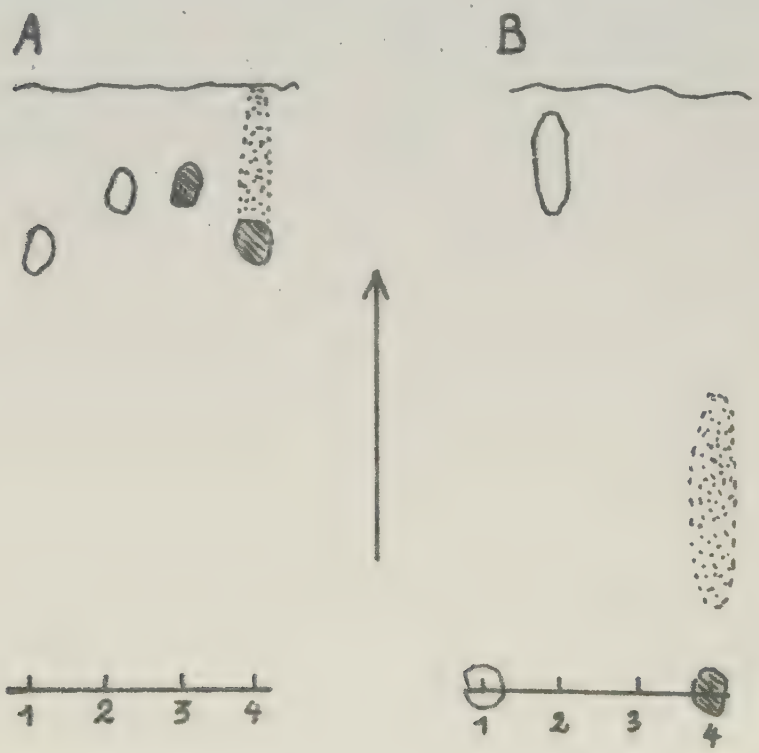


Figure 34
Réaction ninhydrine-amphétamine.
Etude chromatographique (voir texte).
1 - Témoin amphétamine. 2 - Témoin ninhydrine.
3 - Mélange réactionnel (irradiation après la séparation chromatographique).
4 - Mélange réactionnel (après addition de ninhydrine et irradiation).
Les taches colorées en violet ont été ombrées.
Phase solvante : A - n-butanol, éthanol, eau (2:1:2)
B - alcool benzylique, n-butanol, eau (80:15:5).

Vu et approuvé

Bordeaux, le juillet 1970

Le Doyen

J. VALADE